

## DESCRIPTION

### PARAMYXOVIRUS-DERIVED RNP

#### 5 Technical Field

The present invention relates to paramyxovirus-derived ribonucleoprotein complex and the utilization thereof.

#### Background Art

10 Paramyxovirus is a virus comprising negative-strand RNA as the genome. Negative-strand RNA viral vectors have several characteristics significantly different from retroviruses, DNA viruses or positive-strand RNA virus vectors. Genomes or antigenomes of negative-strand RNA viruses do not directly function as mRNA, so  
15 they cannot initiate the synthesis of viral proteins and genome replication. Both RNA genome and antigenome of these viruses always exist in the form of a ribonucleoprotein complex (RNP), so they hardly cause problems caused by antisense strands, such as interfering with the assembly of genome to RNP due to mRNA hybridizing with naked  
20 genomic RNA, as in the case of positive strand RNA viruses. These viruses comprise their own RNA polymerases, performing the transcription of viral mRNAs or replication of viral genomes using RNP complex as the template. Worthy of mentioning is that negative-strand RNA (nsRNA) viruses proliferate only in the cytoplasm  
25 of host cells, causing no integration thereof into chromosomes, because they do not go through a DNA phase. Furthermore, no homologous recombination among RNAs has been recognized. These properties are considered to contribute a great deal to the stability and safety of negative-strand RNA viruses as gene expressing vectors.

30 Among negative-strand RNA viruses, present inventors have been focusing their attention on the Sendai virus (SeV). Sendai virus is a non-segmented type negative-strand RNA virus belonging to the genus Paramyxovirus, and is a type of murine parainfluenza virus. This virus has been said to be non-pathogenic towards humans. In addition,  
35 an attenuated laboratory strain (Z strain) of Sendai virus has been isolated, which only induces mild pneumonia in rodents, the natural

hosts (J. General Virology (1997) 78, 3207-3215). This strain has been widely used as a research model for molecular level studies of the transcription-replication mechanism of paramyxoviruses. Sendai virus attaches to the host cell membrane and cause membrane fusion via its two envelope glycoproteins, hemagglutinin-neuraminidase (HN) and fusion protein (F), and efficiently releases its own RNA polymerase and RNA genome existing in the form of ribonucleoprotein complex (RNP) into the cytoplasm of host cells to carry out transcription of viral mRNA and genome replication therein (Bitzer, M. et. al., J. Virol. 71(7): 5481-5486, 1997).

Present inventors have hitherto developed a method for recovering infectious Sendai virus particles from cDNA corresponding to Sendai virus genome. In this method, for example, after infecting LLC-MK2 cells with vaccinia virus encoding T7 RNA polymerase, the cells are further transfected simultaneously with three plasmids encoding the antigenome of Sendai virus under the control of T7 promoter, the nucleoprotein (NP) of Sendai virus and the RNA polymerase proteins (P and L), respectively, to form antigenomic ribonucleoprotein complexes (RNPs) as intermediates of viral genome replication in the cells, and then replicate biologically active (functional) genomic RNPs capable of initiating viral protein transcription and virus particle assembly. When recovering the wild-type Sendai virus, these functional genomic RNPs are injected into chorioallantoic sac of chicken eggs together with reconstituted cells to perform virion multiplication (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)).

However, Sendai virus has been known to incorporate host cell proteins thereto during virion formation (J. Biol. Chem. (1997) 272, 16578-16584), and such incorporated proteins maybe possible causes of antigenicity and cytotoxicity when transferred to target cells.

In this regard, in spite of the obvious need existing for the use of RNP as vectors without utilizing Sendai virus particles, there has been no report on such a utilization.

### Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to isolate an RNP

deriving from a virus belonging to the family Paramyxoviridae, and to provide the utilization thereof as a vector. In a preferred embodiment, vectors comprising a complex of RNP with a cationic compound are provided.

5       The present inventors have prepared RNPs from Sendai virus belonging to the family Paramyxoviridae and investigated their use as a vector.

Specifically, first, the present inventors prepared a Sendai virus genomic cDNA deficient in the gene for the F protein, which  
10 is one of the envelope proteins of the virus, so as not to produce wild-type Sendai viruses in target cells, and further constructed a vector to express the cDNA in cells (GFP gene is inserted into the vector as a reporter at the F gene-deficient site). The vector thus prepared was transferred to cells expressing proteins required for  
15 RNP formation to produce an RNP comprising an F gene-deficient genome. Then, the RNP was removed from the cells by repeating cycles of freezing and thawing of the cells, mixed with a cationic lipofection reagent, and transferred to F gene-expressing cells. As a result, the expression of GFP as a reporter was detected in the cells to which  
20 RNP was transfected.

Namely, present inventors succeeded not only in preparing functional RNP from Sendai virus, but also found a possibility to express a foreign gene comprised in RNP, even when this RNP is transferred to target cells utilizing, for example, a gene transfer  
25 reagent such as a cationic liposome, in stead of just infecting the RNP to cells as a constituting element of Sendai virus, and thus accomplished this invention.

Namely, this invention relates to paramyxovirus-derived RNP and the utilization thereof as a vector, more specifically to:

30 (1) a complex comprising (a) a negative-strand single-stranded RNA derived from a paramyxovirus, wherein said RNA is modified so as not express at least one of the envelope proteins of Paramyxoviridae viruses, and (b) a protein encoded by and binding to said negative-strand single-stranded RNA;

35 (2) a complex according to (1), wherein said negative-strand single-stranded RNA is modified so as to express NP, P and L proteins,

but not F, HN or M proteins, or any combination thereof;

(3) a complex according to (1) or (2), wherein said negative-strand single-stranded RNA derives from the Sendai virus;

(4) a complex according to any of (1) through (3), wherein said negative-strand single-stranded RNA further encodes a foreign gene;

(5) a composition for gene transfer, comprising a complex according to (4) and a cationic lipid;

(6) a composition for gene transfer, comprising a complex according to (4) and a cationic polymer; and,

(7) a method for expressing a foreign gene in a cell, comprising the step of introducing the composition for gene transfer according to (5) or (6) into a cell..

"NP, P, M, F, HN and L genes" of viruses belonging to the family Paramyxoviridae refer to genes encoding nucleocapsid, phospho, matrix, fusion, hemagglutinin-neuraminidase and large proteins, respectively. Respective genes of viruses belonging to subfamilies of the family Paramyxoviridae are represented in general as follows. NP gene is generally described also as the "N gene".

Genus	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
Respirovirus							
Genus	N	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Rubullavirus							
Genus	N	P/C/V	M	F	H	-	L
Morbillivirus							

Database accession numbers for nucleotide sequences of genes of the Sendai virus classified into Respirovirus of the family Paramyxoviridae are, M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046 and X17218 for NP gene, M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 and X17008 for P gene, D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584 and X53056 for M gene, D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 and X02131 for F gene, D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808 and X56131 for HN gene, and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 and X58886 for L gene.

The present invention relates to a ribonucleoprotein complex (RNP) derived from viruses belonging to the family Paramyxoviridae

deficient in any of the envelope genes. The complex is modified so as not to produce the virus having the envelope protein in target cells in the absence of the envelope protein. That is, RNP according to this invention comprises (a) a negative-strand single-stranded RNA originating in paramyxovirus modified so as not to express at least one of envelope proteins of Paramyxoviridae viruses (b) a protein encoded by and binding to said negative-strand single-stranded RNA.

Proteins capable of binding to a negative-strand single-stranded RNA refer to proteins binding directly and/or indirectly to the negative-strand single-stranded RNA to form an RNP complex with the negative-strand single-stranded RNA. In general, negative-strand single-stranded RNA (genomic RNA) of paramyxovirus is bound to NP, P and L proteins. RNA contained in this RNP serves as the template for transcription and replication of RNA (Lamb, R. A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae : The viruses and their replication*, pp. 1177-1204. In *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). Complexes of this invention include those comprising negative-strand single-stranded RNAs originating in paramyxovirus and proteins also originating in paramyxovirus which bind to the RNAs. Complexes of this invention are RNP complexes comprising, for example, negative-strand single-stranded RNA to which these proteins (NP, P and L proteins) are bound. In general, RNP complexes of paramyxovirus are capable of autonomously self-replicating in host cells. Thus, RNPs transferred to cells intracellularly proliferate to increase the copy number of the gene (RNA contained in RNP complex), thereby leading to a high level expression of a foreign gene from RNP carrying the foreign gene. Vectors of this invention are preferably those capable of replicating RNA comprised in complexes (RNP) in transfected cells.

The origin of RNP complexes of this invention is not limited as long as it is a virus of family Paramyxoviridae, but Sendai virus belonging to the genus Paramyxovirus is especially preferred. Besides Sendai virus, RNPs of this invention may derive from the measles virus, simian parainfluenza virus (SV5) and human

parainfluenza virus type 3, but the origin is not limited thereto.

Negative-strand single-stranded RNAs contained in RNPs of this invention are constructed so as to suppress the expression of at least one of the envelope proteins of Paramyxoviridae viruses.

5 Examples of envelope proteins the expressions of which are suppressed are, F protein, HN protein, or M protein, or any combination thereof. negative-strand single-stranded RNAs are constructed so as to express NP, P and L proteins that are required for the formation of RNPs. negative-strand single-stranded RNAs contained in RNPs of  
10 this invention may be modified, for example, so as to express NP, P and L proteins, but not F and/or HN proteins.

In the case of Sendai virus (SeV), the genome of the natural virus is approximately 15,000 nucleotides in size, and the negative-strand comprises six genes encoding NP (nucleocapsid), P  
15 (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin- neuraminidase) and L (large) proteins lined in a row following the 3'-short leader region, and a short 5'-trailer region on the other end. In this invention, this genome can be modified so as not to express envelope proteins by designing a genome deficient in any of F, HN and M genes,  
20 or any combination thereof. Deficiency in either F gene or HN gene, or both is preferred. Since these proteins are unnecessary for the formation of RNP, RNPs of this invention can be manufactured by transcribing this genomic RNA (either positive or negative-strand ) in the presence of NP, P and L proteins. RNP formation can be performed,  
25 for example, in LLC-MK2 cells, or the like. NP, P and L proteins can be supplied by introducing to cells expression vectors carrying the respective genes for these proteins (cf. examples). Each gene may be also incorporated into chromosomes of host cells. NP, P and L genes to be expressed for the formation of RNP need not be completely  
30 identical to those genes encoded in the genome contained in RNP. That is, amino acid sequences of proteins encoded by these genes may not be identical to those of proteins encoded by RNP genome, as long as they can bind to the genomic RNA and are capable of replicating RNP in cells, and may have mutations or may be replaced with a homologous  
35 gene from other viruses. Once an RNP is formed, NP, P and L genes are expressed from this RNP to autonomously replicate RNP in the cells.

To reconstitute and amplify an RNP in cells, the RNP is either transferred to cells (helper cells) expressing envelope proteins whose expression is suppressed by modifying negative-strand single-stranded RNA contained in the RNP, or the RNP can be reconstituted in these cells. For example, to amplify RNP from negative-strand single-stranded RNA which has been modified so as not to express F gene, F protein is arranged to be expressed together with NP, P and L proteins in the cells. Thus, a viral vector retaining envelope proteins is constructed, and amplified via its infection to helper cells.

In addition, it is also possible to use envelope proteins different from that whose expression was suppressed by modifying negative-strand single-stranded RNA. There is no particular limitation on the type of such envelope proteins. One example of other viral envelope proteins is the G protein (VSV-G) of vesicular stomatitis virus (VSV). RNP complexes of this invention can be amplified, for example, using cells expressing the G protein (VSV-G) of VSV.

Complexes of this invention can be usually prepared by (a) introducing a vector DNA encoding paramyxovirus-derived negative-strand single-stranded RNA that has been modified so as not to express at least one of the viral envelope proteins of Paramyxoviridae viruses, or a complementary strand of said RNA, into cells (helper cells) expressing envelope proteins to express the RNAs, and (b) culturing the cells to recover RNP complexes from the culture supernatant or cell extracts. By coexpressing NP, L and P proteins at the time of vector DNA expression, RNPs are formed and a virus having envelope proteins is constructed.

Vector DNA to be expressed in helper cells encodes negative-strand single-stranded RNA (negative-strand ) or complementary strand thereof (positive strand) contained in complexes of this invention. Although the strand to be transcribed inside cells may be either positive or negative-strand, it is preferable to arrange so as to transcribe the positive strand for the improvement of complex reconstitution efficiency. For example, DNA encoding negative-strand single-stranded RNA or complementary strand thereof

is linked downstream of T7 promoter to be transcribed to RNA by T7 RNA polymerase.

For example, a virus comprising RNP complex can be reconstituted by transfecting a plasmid expressing a recombinant Sendai virus genome deficient in envelope genes into host cells, together with a vector expressing the deficient envelope protein and NP, P/C and L protein expression vectors. Alternatively, RNP complex can be manufactured using, for example, host cells incorporated with F gene into chromosomes thereof. Amino acid sequences of these protein groups supplied from outside the viral genome need not be identical to those deriving from the virus. As long as these proteins are equally active to or more active than natural type proteins in transferring nucleic acids into cells, genes encoding these proteins may be modified by introducing a mutation or replacing with homologous genes from other viruses. Since, in general, it has been known that long-term culture of host cells is sometimes difficult because of cytotoxicity and cell shape-altering activity of envelope proteins, they may be arranged to be expressed only when the vector is reconstituted under the control of an inducible promoter (cf. examples).

Once RNP or virus comprising RNP is formed, complexes of this invention can be amplified by introducing this RNP or virus again into the aforementioned helper cells and culturing them. This process comprises the steps of (a) introducing either the complex of this invention or viral vector comprising the complex to cells expressing envelope proteins, and (b) culturing the cells and recovering virus particles from the culture supernatant or cell extracts.

RNP may be introduced to cells as a complex formed together with, for example, lipofectamine and polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be utilized. Examples thereof are DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. Chloroquine may be added to prevent RNP from decomposition in endosomes (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015).

Once a viral vector is thus constructed in host cells, complexes of this invention or viral vector comprising the complexes can be

further amplified by coculturing these cells with cells expressing envelope proteins. As described in Example 12, a preferable example is the method of overlaying cells expressing envelope proteins on virus producing cells.

5           Complexes of this invention, for example, may comprise a viral gene encoded in RNA in the complex that has been modified to reduce the antigenicity or enhance the RNA transcription and replication efficiency.

10           Complexes of this invention may include RNA encoding a foreign gene in their negative-strand single-stranded RNA. Any gene desired to be expressed in target cells may be used as the foreign gene. For example, when gene therapy is intended, a gene for treating an objective disease is inserted into the vector DNA encoding RNA contained in complexes. In the case where a foreign gene is inserted  
15 into the vector DNA, for example, Sendai virus vector DNA, it is preferable, to insert a sequence comprising a nucleotide number of a multiple of six between the transcription termination sequence (E) and transcription initiation sequence (S), etc. (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p.4822-4830). The foreign gene may be inserted  
20 before or after each of the viral genes (NP, P, M, F, HN and L genes) (cf. examples). E-I-S sequence (transcription initiation sequence-intervening sequence-transcription termination sequence) or portion thereof is appropriately inserted before or after a foreign gene so as not to interfere with the expression of genes before or  
25 after the foreign gene. Expression level of the inserted foreign gene can be regulated by the type of transcription initiation sequence added upstream of the foreign gene, as well as the site of gene insertion and nucleotide sequences before and after the gene. For example, in Sendai virus, the nearer the insertion site is to the  
30 3'-end of negative-strand RNA (in the gene arrangement on the wild type viral genome, the nearer to NP gene), the higher the expression level of the inserted gene is. To secure a high expression level of a foreign gene, it is preferable to insert the foreign gene upstream of NP gene (the 3'-side in negative-strand) or between NP and P genes.  
35 Conversely, the nearer the insertion position is to the 5'-end of negative-strand RNA (in the gene arrangement on the wild type viral

genome, the nearer to L gene), the lower the expression level of the inserted gene is. To suppress the expression of a foreign gene to a low level, the foreign gene is inserted, for example, to the far most 5'-side of the negative-strand, that is, downstream of L gene in the wild type viral genome (the 5'-side adjacent to L gene in negative-strand) or upstream of L gene (the 3'-side adjacent to L gene in negative-strand). To facilitate the insertion of a foreign gene, a cloning site may be designed at the inserting position. Cloning site can be arranged to be, for example, the recognition sequence for restriction enzymes. Foreign gene fragments can be inserted into the restriction enzyme site in the vector DNA encoding the genome. Cloning site may be arranged to be a so-called multi-cloning site comprising a plurality of restriction enzyme recognition sequences. RNA genome in complexes of this invention may harbor at the insertion sites foreign genes other than those described above.

Viral vectors comprising RNP complex derived from recombinant Sendai virus carrying a foreign gene can be constructed as follows according to, for example, the description in "Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587" and "Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466".

First, a DNA sample comprising the cDNA nucleotide sequence of a desired foreign gene is prepared. It is preferable that the DNA sample can be electrophoretically identified as a single plasmid at concentrations of 25 ng/ $\mu$ l or more. Below, a case where a foreign gene is inserted to DNA encoding viral genome utilizing NotI site will be described as an example. When NotI recognition site is included in the objective cDNA nucleotide sequence, it is preferable to delete the NotI site beforehand by modifying the nucleotide sequence using site-specific mutagenesis and such method so as not to alter the amino acid sequence encoded by the cDNA. From this DNA sample, the desired gene fragment is amplified and recovered by PCR. To have NotI sites on the both ends of amplified DNA fragment and further add a copy of transcription termination sequence (E), intervening sequence (I) and transcription initiation sequence (S) (EIS sequence) of Sendai virus to one end, a forward side synthetic DNA sequence and reverse side synthetic DNA sequence (antisense

strand) are prepared as a pair of primers containing NotI restriction enzyme cleavage site sequence, transcription termination sequence (E), intervening sequence (I), transcription initiation sequence (S) and a partial sequence of the objective gene.

5 For example, to secure cleavage by NotI, the forward side synthetic DNA sequence is arranged in a form in which any two or more nucleotides (preferably 4 nucleotides excluding GCG and GCC, sequences originating in NotI recognition site, more preferably ACTT) are selected on the 5'-side of the synthetic DNA, NotI recognition  
10 site "gcggccgc" is added to its 3'-side, and to the 3'-side thereof, any desired 9 nucleotides or nucleotides of 9 plus a multiple of 6 nucleotides are added as the spacer sequence, and to the 3'-side thereof, about 25 nucleotide-equivalent ORF including the initiation codon ATG of the desired cDNA is added. It is preferable to select  
15 about 25 nucleotides from the desired cDNA as the forward side synthetic DNA sequence so as to have G or C as the final nucleotide on its 3'-end.

In the reverse side synthetic DNA sequence, any two or more nucleotides (preferably 4 nucleotides excluding GCG and GCC, sequences originating in the NotI recognition site, more preferably  
20 ACTT) are selected from the 5'-side of the synthetic DNA, NotI recognition site "gcggccgc" is added to its 3'-side, and to its further 3'-side, an oligo DNA is added as the insertion fragment to adjust the length. This oligo DNA is designed so that the total nucleotide  
25 number including the NotI recognition site "gcggccgc", complementary sequence of cDNA and EIS nucleotide sequence of Sendai virus genome originating in the virus described below becomes a multiple of six (so-called "rule of six"; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72: 891-899, 1998). Further to the 3'-side of inserted fragment, a sequence  
30 complementary to S sequence of Sendai virus, preferably 5'-CTTTCACCCT-3', I sequence, preferably 5'-AAG-3', and a sequence complementary to E sequence, preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3', is added, and further to the 3'-side thereof, about 25 nucleotide-equivalent complementary sequence counted in the reverse  
35 direction from the termination codon of the desired cDNA sequence the length of which is adjusted to have G or C as the final nucleotide,

is selected and added as the 3'-end of the reverse side synthetic DNA.

PCR can be done according to the usual method with, for example, ExTaq polymerase (Takara Shuzo). Preferably, PCR is performed using  
 5 Vent polymerase (NEB), and desired fragments thus amplified are digested with NotI, then inserted to NotI site of the plasmid vector pBluescript. Nucleotide sequences of PCR products thus obtained are confirmed with a sequencer to select a plasmid having the right sequence. The inserted fragment is excised from the plasmid using  
 10 NotI, and cloned to the NotI site of the plasmid carrying the genomic cDNA deficient in envelope genes. Alternatively, it is also possible to obtain the recombinant Sendai virus cDNA by directly inserting the fragment to the NotI site without the mediation of the plasmid vector pBluescript.

15 It is also possible to transcribe a vector DNA encoding the virus genome in test tubes or cells, reconstitute RNP with viral L, P and NP proteins, and produce the virus vector comprising this RNP. Reconstitution of virus from the vector DNA can be carried out according to methods known in the art using cells expressing envelope  
 20 proteins (WO97/16539 and 97/16538: Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D.  
 25 et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404). When a viral vector DNA is made deficient in F, HN and/or M genes, infectious virus particles are not formed  
 30 with such a defective vector. However, it is possible to form infectious virus particles and amplify the virus comprising the complex by separately transferring these deficient genes, genes encoding other viral envelope proteins and such to host cells and expressing them therein.

35 Methods for transferring vector DNA into cells include the following: 1) the method of preparing DNA precipitates that can be

be taken up by objective cells; 2) the method of preparing a DNA comprising complex which is suitable for being taken up by objective cells and which is also not very cytotoxic and has a positive charge, and 3) the method of instantaneously boring on the objective cellular  
 5 membrane pores wide enough to allow DNA molecules to pass through by electric pulse.

In Method 2), a variety of transfection reagents can be utilized, examples being DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. An example of Method 1) is  
 10 a transfection method using calcium phosphate, in which DNA that entered cells are incorporated into phagosomes, and a sufficient amount is incorporated into the nuclei as well (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223). Chen and Okayama have investigated the  
 15 optimization of the transfer technique, reporting that optimal DNA precipitates can be obtained under the conditions where 1) cells are incubated with DNA in an atmosphere of 2 to 4% CO<sub>2</sub> at 35°C for 15 to 24 h, 2) cyclic DNA with a higher precipitate-forming activity than when linear DNA is used, and 3) DNA concentration in the precipitate  
 20 mixture is 20 to 30 µg/ml (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745). Method 2) is suitable for a transient transfection. An old method is known in the art in which a DEAE-dextran (Sigma #D-9885, M.W.  $5 \times 10^5$ ) mixture is prepared in a desired DNA concentration ratio to perform the transfection. Since most of the complexes are  
 25 decomposed inside endosomes, chloroquine may be added to enhance transfection effects (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). Method 3) is referred to as electroporation, and is more versatile compared to methods 1) and 2) because it doesn't have cell selectivity. Method 3) is said to be efficient under optimal  
 30 conditions for pulse electric current duration, pulse shape, electric field potency (gap between electrodes, voltage), conductivity of buffers, DNA concentration, and cell density.

Among the above-described three categories, transfection reagents (method 2)) are suitable in this invention, because method  
 35 2) is easily operable, and facilitates the examining of many test samples using a large amount of cells. Preferably, Superfect

Transfection Reagent (QIAGEN, Cat. No. 301305) or DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1811169) is used.

Specifically, the reconstitution of the viral vector from cDNA can be performed as follows.

5           Simian kidney-derived LLC-MK2 cells are cultured in 24-well to 6-well plastic culture plates or 100 mm diameter culture dish using a minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to 70 to 80% confluency, and infected, for example, with recombinant  
10   vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase at 2 PFU/cell. This virus has been inactivated by a UV irradiation treatment for 20 min in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996). Amount of psoralen added and UV irradiation time can  
15   be appropriately adjusted. One hour after the infection, the cells are transfected with 2 to 60 µg, more preferably 3 to 5 µg, of the above-described recombinant Sendai virus cDNA by the lipofection method and such using plasmids (24 to 0.5 µg of pGEM-N, 12 to 0.25 µg of pGEM-P and 24 to 0.5 µg of pGEM-L, more preferably 1 µg of pGEM-N,  
20   0.5 µg of pGEM-P and 1 µg of pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) expressing trans-acting viral proteins required for the production of full-length Sendai viral genome together with Superfect (QIAGEN). The transfected cells are cultured in a serum-free MEM containing 100 µg/ml each of rifampicin (Sigma) and  
25   cytosine arabinoside (AraC) if desired, more preferably only containing 40 µg/ml of cytosine arabinoside (AraC) (Sigma), and concentrations of reagents are set at optima so as to minimize cytotoxicity due to the vaccinia virus and maximize the recovery rate of the virus (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1, 569-579). After  
30   culturing for about 48 to 72 h following the transfection, the cells are recovered, disrupted by repeating three cycles of freezing and thawing, transfected to LLC-MK2 cells expressing envelope proteins, and cultured. After culturing the cells for 3 to 7 days, the culture solution is collected. Alternatively, infectious virus vectors can  
35   be obtained more efficiently by transfecting LLC-MK2 cells already expressing envelope proteins with plasmids expressing NP, L and P

proteins, or transfecting together with an envelope-expressing plasmid. Viral vectors can be amplified by culturing these cells overlaid on LLC-MK2 cells expressing envelope proteins (cf. examples). Virus titer contained in the culture supernatant can be determined  
5 by measuring the hemagglutination activity (HA), which can be assayed by "endo-point dilution method" (Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1, 569-579). Virus stock thus obtained can be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The type of host cells used for virus reconstitution is not particularly limited, so long as RNP complex or viral vector can be  
10 reconstituted therein. For example, in the reconstitution of Sendai virus vector or RNP complex, culture cells such as simian kidney-derived CV-1 cells and LLC-MK2 cells, hamster kidney-derived BHK cells, and so on can be used. Infectious virus particles having the envelope can be also obtained by expressing appropriate envelope  
15 proteins in these cells. To obtain Sendai virus vector in a large quantity, the virus can be amplified, for example, by inoculating RNP or virus vector obtained from the above-described host cells into embryonated chicken eggs together with vectors expressing envelope genes. Alternatively, viral vectors can be produced using transgenic  
20 chicken eggs incorporated with envelope protein genes. Methods for manufacturing viral fluid using chicken eggs have been already developed (Nakanishi, et al. (eds.), 1993, "Shinkei-kagaku Kenkyu-no Sentan-gijutu Protocol III (High Technology Protocol III of Neuroscience Research), Molecular Neurocyte Physiology, Koseisha, Osaka, pp.153-172). Specifically, for example, fertilized eggs are  
25 placed in an incubator and incubated for 9 to 12 days at  $37$  to  $38^{\circ}\text{C}$  to grow embryos. Sendai virus vector or RNP complex is inoculated together with vectors expressing envelope proteins into chorioallantoic cavity of eggs, and cultured for several days to  
30 proliferate the virus. Conditions such as culture duration may be varied depending on the type of recombinant Sendai virus used. Subsequently, chorioallantoic fluid comprising the virus is recovered. Separation and purification of Sendai virus vector can be performed according to the standard methods (Tashiro, M., "Virus Experiment  
35 Protocols", Nagai and Ishihama (eds.), Medicalview, pp. 68-73 (1995)).

As a vector to express envelope proteins, complexes of this invention or viral vectors themselves comprising complexes of this invention may be used. For example, when two types of RNP complexes in which the envelope gene deficient from the viral genome is different are transferred to the same cell, the envelope protein deficient in one RNP complex is supplied by the expression of the other complex to complement each other, thereby leading to the formation of infectious virus particles and activation of replication cycle to amplify the virus. That is, when two or more types of RNP complexes of this invention or viral vectors comprising these complexes are inoculated to cells in combinations so as to complement each other's envelope proteins, mixtures of viral vectors deficient in respective envelope proteins can be produced on a large scale and at a low cost. Mixed viruses thus produced are useful for the production of vaccines and such. Due to the deficiency of envelope genes, these viruses have a smaller genome size compared to the complete virus, so they can harbor a long foreign gene. Also, since these originally non-infectious viruses are extracellularly diluted, and its difficult to retain their coinfection, they become sterile, which is advantageous in managing their release to the environment.

Preparation of RNP of this invention from a virus can be carried out, for example, using the ultracentrifugation method as follows. Triton X-100 is added to a filtration fluid comprising virus particles to make the final concentration 0.5%, and the mixture is allowed to stand at room temperature for 10 to 15 min. The supernatant thus obtained is layered on a 10 to 40% sucrose density gradient, and centrifuged at 20,000 to 30,000 rpm for 30 min to recover RNP-comprising fractions.

Alternatively, the virus is dissolved in a mixture containing 0.6% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1 M KCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 5 mM EDTA (final concentrations), allowed to stand at 20°C for 20 min, and then centrifuged at 11,000 x g for 20 min. Supernatant comprising RNP is layered on 50% glycerol comprising 0.2% NP40, 30 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, and centrifuged at 39,000 rpm for 2 h at 4°C to recover precipitates. RNP complex contained in the precipitates can be purified by

dispersing the precipitates again in a solution containing 0.5% Triton X-100, layering the dispersion on a 10 to 40% sucrose density gradient, and centrifuging it at 20,000 to 30,000 rpm for 30 min to recover a single band containing a highly purified RNP.

5           Complexes of this invention can be appropriately diluted, for example, with physiological saline and phosphate-buffered physiological saline (PBS) to prepare a composition. When complexes of this invention are proliferated in chicken eggs and such, the composition can include chorioallantoic fluid. Compositions  
10 comprising complexes of this invention may contain physiologically acceptable media such as deionized water, 5% dextrose aqueous solution, and so on, and, furthermore, other stabilizers and antibiotics may also be contained.

          Once RNP-comprising RNA inserted with a foreign gene is prepared,  
15 it can be transferred to target cells using gene transfer reagents. As gene transfer reagents, cationic lipids or cationic polymers are preferred.

          Cationic lipids include compounds represented by Formula (I) in Published Japanese Translation of International Publication No.  
20 Hei 5-508626. Preferably, cationic lipids are synthetic lipidic compounds. Cationic lipids may be also diether or diester compounds, preferably aliphatic ethers. Specific examples are the following compounds:

DOGS (Transfectam<sup>TM</sup>) or DOTMA (Lipofectin<sup>TM</sup>) (diether compound),  
25 DOTAP (diester compound),  
DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine),  
DOPC (dioleoylphosphatidylcholine),  
DPRI Rosenthal inhibitor (RI) (dipalmitoyl derivative of DL-2,3-  
distearoyloxypropyl (dimethyl)  $\beta$ -hydroxyethylammonium bromide  
30 (Sigma), and  
DORI (dioleoyl derivative of the above compound).

          Cationic polymers are cationic high molecular compounds, preferably synthetic molecules. Specific examples are polylysine, aliphatic polyamines, polyethyleneimine, etc.

35           Complexes of this invention can be mixed with the above-described cationic lipids or cationic polymers to prepare

compositions for gene transfer. This composition for gene transfer can be appropriately combined with a medium such as physiological saline, and solutes such as salts, stabilizers, etc. By adding the composition for gene transfer of this invention to cells, the complex of this invention can be transferred into the cells to express the gene from RNA contained in the complex.

Gene therapy is enabled when a therapeutic gene is used as the foreign gene. In the application of complexes of this invention to gene therapy, it is possible to express a foreign gene with which treatment effects are expected or an endogenous gene the supply of which is insufficient in the patient's body, by either direct or indirect (ex vivo) administration of the complex. There is no particular limitation on the type of foreign gene, and in addition to nucleic acids encoding proteins, they may be nucleic acids encoding no proteins, such as an antisense or ribozyme. In addition, when genes encoding antigens of bacteria or viruses involved in infectious diseases are used as foreign genes, immunity can be induced in animals by administering these genes to the animals. That is, these genes can be used as vaccines.

When using as vaccines, they may be applicable for, for example, cancers, infectious diseases and other general disorders. For example, as a cancer treatment, it is possible to express genes with therapeutic effects on tumor cells or antigen presenting cells (APC) such as DC cells. Examples of such genes are those encoding the tumor antigen Muc-1 or Muc-1 like mutin tandem repeat peptide (US Patent No. 5,744,144), melanoma gp100 antigen, etc. Such treatments with genes have been widely applied to cancers in the mammary gland, colon, pancreas, prostate, lung, etc. Combination with cytokines to enhance adjuvant effects is also effective in gene therapy. Examples of such genes are i) single-chain IL-12 in combination with IL-2 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, ii) interferon- $\gamma$  in combination with IL-2 (US Patent No. 5,798,100), iii) granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) used alone, and iv) GM-CSF aiming at the treatment of brain tumor in combination with IL-4 (J. Neurosurgery, 90 (6), 1115-1124 (1999)), etc.

Examples of genes used for the treatment of infectious diseases

are those encoding the envelope protein of the virulent strain H5N1 type of influenza virus, the envelope chimera protein of Japanese encephalitis virus (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999)), the HIV gag or SIV gag protein of AIDS virus (J. Immunology (2000), vol. 164, 4968-4978), the HIV envelope protein, which is incorporated as a oral vaccine encapsulated in polylactate- glycol copolymer microparticles for administration (Kaneko, H. et al., Virology 267, 8-16 (2000)), the B subunit (CTB) of cholera toxin (Arakawa, T. et al., Nature Biotechnology (1998) 16 (10): 934-8; Arakawa, T. et al., Nature Biotechnology (1998) 16 (3): 292-297), the glycoprotein of rabies virus (Lodmell, D. L. et al., 1998, Nature Medicine 4 (8): 949-52), and the capsid protein L1 of human papilloma virus 6 causing cervical cancer (J. Med. Virol., 60, 200-204 (2000)).

Gene therapy may also be applied to general disorders. For example, in the case of diabetes, the expression of insulin peptide fragment by inoculation of plasmid DNA encoding the peptide has been performed in type I diabetes model animals (Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104 (2): 189-94).

## Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a photograph showing an analytical result of the expression of F protein via a Cre-loxP-inducible expression system by Western blotting. It shows the result of detecting proteins on a transfer membrane cross-reacting to the anti-SeV-F antibody by chemiluminescence method.

Figure 2 indicates a diagram showing an analytical result of cell-surface display of F protein the expression of which was induced by the Cre-loxP system. It shows results of flow cytometry analysis for LLC-MK2/F7 with the anti-SeV-F antibody.

Figure 3 indicates a photograph showing the result confirming cleavage of the expressed F protein by trypsin using Western blotting.

Figure 4 indicates photographs showing the result confirming cell-surface expression of HN in an experiment of cell-surface adsorption onto erythrocytes.

Figure 5 indicates photographs showing the result obtained by an attempt to harvest the deficient viruses by using cells expressing

the deficient protein. It was revealed that the expression of F protein by the helper cell line was stopped rapidly by the vaccinia viruses used in the reconstitution of F-deficient SeV.

1. LLC-MK2 and CV-1 represent cell lysates from the respective cell types alone.
2. LLC-MK2/F+ad and CV-1/F+ad represent cell lysates from the respective cells that have been subjected to the induction of expression and to which adenovirus AxCANCre has been added.
3. LLC-MK2/F-ad and CV-1/F-ad represent cell lysates from the respective cell lines in which the F gene but no adenovirus AxCANCre has been introduced.
4. LLC-MK2/F+ad 3rd represents a cell lysate from cells in which the expression was induced by adenovirus AxCANCre and which were then further passaged 3 times.
5. 1d and 3d respectively indicate one day and three days after the induction of expression.
6. Vac1d and Vac3d respectively indicate cells one day and three days after the infection of vaccinia virus.
7. AraC1d and AraC3d respectively indicate cells one day and three days after the addition of AraC.
8. CHX 1d and CHX 3d respectively indicate cells one day and three days after the addition of protein synthesis inhibitor cycloheximide.

Figure 6 indicates photographs showing the result that was obtained by observing GFP expression after GFP-comprising F-deficient SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) was transfected into LLC-MK2 cells in which F was not expressed (detection of RNP). In a control group, the F gene was shuffled with the NP gene at the 3' end, and then, SeV cDNA (F-shuffled SeV), in which GFP had been introduced into the F-deficient site, was used. The mark "all" indicates cells transfected with plasmids directing the expression of the NP gene, P gene, and L gene (pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L) together with SeV cDNA at the same time; "cDNA" indicates cells transfected with cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) alone. For RNP transfection, P0 cells expressing GFP were collected; the cells (10<sup>7</sup> cells/ml) were suspended in OptiMEM (GIBCO BRL); 100 μl of lysate prepared after treating three times with freeze-thaw cycles was mixed with 25 μl of cationic liposome

DOSPER (Boehringer Mannheim) and allowed to stand still at room temperature for 15 minutes; and the mixture was added to cells (+ad) in which the expression of F had been induced to achieve the RNP transfection. Cells expressing Cre DNA recombinase, in which no recombinant adenovirus had been introduced, were used as a control group of cells (-ad). The result showed that GFP was expressed depending on the RNP formation of SeV in P0 in LLC-MK2 cells; and the F-deficient virus was amplified depending on the induction of expression of F in P1.

Figure 7 indicates photographs showing the result that was obtained by studying whether functional RNP reconstituted with F-deficient genomic cDNA could be rescued by the F-expressing helper cells and form the infective virion of the deficient virus. RNP/o represents cells overlaid with RNP; RNP/t represents cells that was transfected with RNP.

Figure 8 indicates photographs showing the evidence for the F-expressing cell-specific growth of the F-deficient virus. The lysate comprising functional RNP constructed from the genome lacking the gene was lipofected to the F-expressing cells as described in Example 2; and the culture supernatant was then recovered. This culture supernatant was added to the medium of the F-expressing cells to achieve the infection; on the third day, the culture supernatant was recovered and concurrently added to both F-expressing cells and cells that had not expressed F; and then the cells were cultured in the presence or absence of trypsin for three days. The result is shown here. The viruses were amplified only in the presence of trypsin in the F-expressing cells.

Figure 9 indicates photographs showing evidence for specific release of the F-deficient viruses to the culture supernatant after the introduction into F-expressing cells. The lysate comprising functional RNP constructed from the genome lacking the gene was lipofected to the F-expressing cells as described in Example 2 and then the culture supernatant was recovered. This culture supernatant was added to the medium of the F-expressing cells to achieve the infection; on the third day, the culture supernatant was recovered and concurrently added to both F-expressing cells and cells that did

not express F; and then the cells were cultured in the presence or absence of trypsin for three days. The bottom panel shows the result with supernatant of the cells that did not express F.

Figure 10 indicates photographs showing the result obtained by recovering viruses from the culture supernatant of the F-expressing cells, extracting the total RNA and performing Northern blot analysis using F and HN as probes to verify the genomic structure of virion recovered from the F-deficient cDNA. In the viruses recovered from the F-expressing cells, the HN gene was detected but the F gene was not detectable; and thus it was clarified that the F gene was not present in the viral genome.

Figure 11 indicates photographs showing the result of RT-PCR, which demonstrates that the GFP gene is present in the locus where F had been deleted, as in the construct of the cDNA. 1: +18-NP, for the confirmation of the presence of +18 NotI site. 2: M-GFP, for the confirmation of the presence of the GFP gene in the F gene-deficient region. 3: F gene, for the confirmation of the presence of the F gene. The genomic structures of wild type SeV and F-deficient GFP-expressing SeV are shown in the top panel. It was verified that the GFP gene was present in the F-deficient locus, +18-derived NotI site was present at the 3' end of NP and the F gene was absent in any part of the RNA genome.

Figure 12 indicates photographs that were obtained by the immuno-electron microscopic examination with gold colloid-bound IgG (anti-F, anti-HN) specifically reacting to F or HN of the virus. It was clarified that the spike-like structure of the virus envelope comprised F and HN proteins.

Figure 13 indicates diagrams showing the result of RT-PCR, which demonstrates that the structures of genes except the GFP gene were the same as those from the wild type.

Figure 14 indicates photographs showing the result obtained by examining the F-deficient virus particle morphology by electron microscopy. Like the wild-type virus particles, the F-deficient virus particles had helical RNP structure and spike-like structure inside.

Figure 15 indicates photographs showing the result of *in vitro*

gene transfer to a variety of cells using an F-deficient SeV vector with a high efficiency.

Figure 16 indicates diagrams showing the analytical result obtained after the introduction of the F-deficient SeV vector into  
 5 primary bone marrow cells from mouse (BM c-kit+/-). Open bars represent PE-positive/GFP-negative; closed bars represent PE-positive/GFP-positive.

Figure 17 indicates photographs showing the result of *in vivo* administration of the vector into the rat cerebral ventricle.

10 Figure 18 indicates photographs showing the result obtained by using the culture supernatant comprising F-deficient SeV viruses recovered from the F-expressing cells to infect LLC-MK2 cells that do not express F, culturing the cells in the presence or absence of trypsin for three days to confirm the presence of viruses in the  
 15 supernatant by HA assay.

Figure 19 is a photograph showing the result obtained by conducting HA assay of chorioallantoic fluids after a 2-day incubation of embryonated chicken egg that had been inoculated with chorioallantoic fluid (lanes 11 and 12) from HA-positive embryonated  
 20 eggs in Figure 18B.

Figure 20 indicates photographs showing the result obtained by examining the virus liquid, which is HA-positive and has no infectivity, by immuno-electron microscopy. The presence of the virus particles was verified and it was found that the virion envelope  
 25 was reactive to antibody recognizing HN protein labeled with gold colloid, but not reactive to antibody recognizing F protein labeled with gold colloid.

Figure 21 indicates photographs showing the result of transfection of F-deficient virus particles into cells.

30 Figure 22 indicates photographs showing the result of creation of cells co-expressing F and HN, which were evaluated by Western blotting. LLC/VacT7/pGEM/FHN represents cells obtained by transfecting vaccinia-infected LLC-MK2 cells with pGEM/FHN plasmid; LLC/VacT7 represents vaccinia-infected LLC-MK2 cells.  
 35 LLCMK2/FHNmix represents LLC-MK2 cells in which the F and HN genes were introduced but not cloned. LLC/FHN represents LLC-MK2 cells in

which the F and HN genes were introduced and the expression was induced by adenovirus (after 3 days); 1-13, 2-6, 2-16, 3-3, 3-18, 3-22, 4-3 and 5-9 are cell-line numbers (names) in the cloning.

Figure 23 indicates photographs showing the result for the confirmation of virus generation depending on the presence or absence of pGEM/FHN. FHN-deficient GFP-expressing SeV cDNA, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/FHN were mixed and introduced into LLC-MK2 cells. 3 hours after the gene transfer, the medium was changed with MEM containing AraC and trypsin and then the cells were further cultured for three days. 2 days after the gene transfer, observation was carried out with a stereoscopic fluorescence microscope to evaluate the difference depending on the presence or absence of pGEM/FHN, and the virus generation was verified based on the spread of GFP-expressing cells. The result is shown here. When pGEM/FHN was added at the time of reconstitution, the spread of GFP-expressing cells was recognized; but when no pGEM/FHN was added, the GFP expression was observable merely in a single cell.

Figure 24 indicates photographs showing the result of reconstitution by RNP transfection and growth of FHN-deficient viruses. On the third day after the induction of expression, cells co-expressing FHN (12 wells) were lipofected by using P0 RNP overlay or DOSPER, and then GFP was observed after 4 days. When RNP transfection was conducted, the harvest of viruses was successful for P1 FHN-expressing cells as was for the F-deficient ones (top). The growth of the FHN-deficient viruses was verified after inoculating a liquid comprising the viruses to cells in which the expression of FHN protein was induced 6 hours or more after the infection with Ade/Cre (bottom panel).

Figure 25 indicates photographs showing the result obtained after inoculating the liquid comprising viruses reconstituted from FHN-deficient GFP-expressing cDNA to LLC-MK2, LLC-MK2/F, LLC-MK2/HN, and LLC-MK2/FHN and culturing them in the presence or absence of the trypsin. The spread of cells expressing GFP protein was verified 3 days after the culture. The result is shown here. The expansion of GFP was observed only with LLC-MK2/FHN, and thus it was verified that the virus contained in the liquid was grown in a manner specific to

FHN co-expression and dependent on trypsin.

Figure 26 is a photograph showing the result where the confirmation was carried out for the genomic structure of RNA derived from supernatant of the FHN-expressing cells.

5        Figure 27 is a photograph showing the result where the confirmation was carried out for the genomic structure of RNA derived from supernatant of the F-expressing cells infected with the FHN-deficient viruses.

10       Figure 28 is a diagram showing inactivation of vaccinia virus and T7 activity when psoralen concentration was varied in psoralen/UV irradiation.

Figure 29 is a diagram showing inactivation of vaccinia virus and T7 RNA polymerase activity when the duration of UV irradiation was varied in psoralen/UV irradiation.

15       Figure 30 indicates photographs showing a cytotoxicity (CPE) of vaccinia virus after psoralen/UV irradiation.  $3 \times 10^5$  LLC-MK2 cells were plated on a 6-well plate. After culturing overnight, the cells were infected with vaccinia virus at  $\text{moi}=2$ . After 24 hours, CPE was determined. The result of CPE with mock-treatment of vaccinia virus is shown in A; CPE after the treatment with vaccinia virus for 15, 20, or 30 minutes are shown in B, C, and D, respectively.

Figure 31 is a diagram indicating the influence of duration of UV treatment of vaccinia virus on the reconstitution efficiency of Sendai virus.

25       Figure 32 is a diagram indicating the titer of vaccinia virus capable of replicating that remained in the cells after the reconstitution experiment of Sendai virus.

Figure 33 is a photograph showing a result of Western blot analysis using anti-VSV-G antibody.

30       Figure 34 indicates a diagram showing results of flow cytometry analysis using anti-VSV-G antibody. It shows the result of analysis of LLC-MK2 cell line (L1) for the induction of VSV-G expression on the fourth day after AxCANCre infection ( $\text{moi}=0, 2.5, 5$ ). Primary antibody used was anti-VSV-G antibody (MoAb I-1); secondary antibody was FITC-labeled anti-mouse Ig.

Figure 35 indicates photographs showing a result where

supernatants were recovered after the infection with altered amounts of AxCANCre (MOI=0, 1.25, 2.5, 5, 10) and a constant amount of pseudo-type Sendai virus having a F gene-deficient genome, and further the supernatants were used to infect cells before VSV-G induction (-) and after induction (+), and cells expressing GFP were observed after 5 days.

Figure 36 indicates photographs showing the result obtained for the time course of virus production amount.

Figure 37 indicates photographs showing the result obtained by examining whether the infectivity is influenced by the treatment of pseudo-type Sendai virus having the F gene-deficient genome, which was established with the VSV-G-expressing cell line, and FHN-deficient Sendai virus treated with anti-VSV antibody.

Figure 38 indicates photographs showing the result where the expression of the GFP gene was tested as an index to determine the presence of production of the pseudo-type virus having VSV-G in its capsid after the infection of VSV-G gene-expressing cells LLCG-L1 with F and HN-deficient Sendai virus comprising the GFP gene.

Figure 39 indicates photographs showing the result confirming that viruses grown in the VSV-G gene-expressing cells were deficient in F and HN genes by Western analysis of protein in the extract of infected cells.

Figure 40 indicates photographs showing the result for the observation of GFP-expressing cells under a fluorescence microscope.

Figure 41 is a diagram showing the improvement in efficiency for the reconstitution of SeV/ $\Delta$ F-GFP by the combined use of the envelope-expressing plasmid and cell overlay. Considerable improvement was recognized at d3 to d4 (day 3 to day 4) of P0 (prior to passaging).

Figure 42 is a diagram showing the result where treatment conditions were evaluated for the reconstitution of SeV/ $\Delta$ F-GFP by the combined use of the envelope-expressing plasmid and cell overlay. GFP-positive cells represent the amount of virus reconstituted.

Figure 43 is a diagram showing the result where the rescue of F-deficient Sendai viruses from cDNA was tested. It shows the improvement in efficiency for the reconstitution of SeV/ $\Delta$ F-GFP by

the combined use of the envelope-expressing plasmid and cell overlay. All the tests were positive on the seventh day. However, the efficiency was evaluated on the third day where the probability of success was midrange.

5        Figure 44 indicates photographs showing the result of lacZ expression by LacZ-comprising F-deficient Sendai virus vector comprising no GFP.

10       Figure 45 indicates diagrams showing subcloning of Sendai virus genomic cDNA fragment (A) and structures of 5 Sendai virus genomic cDNAs constructed with newly introduced NotI site (B).

Figure 46 is a diagram showing structures of plasmids to be used for cloning to add NotI site, transcription initiation signal, intervening sequence, and transcription termination signal into SEAP.

15       Figure 47 indicates photographs showing the result of plaque assay of each Sendai virus vector. It shows partial fluorescence image in the plaque assay obtained by LAS1000.

Figure 48 is a diagram showing the result where altered expression levels of reporter gene (SEAP) were compared with one another among the respective Sendai virus vectors. The data of SeV18+/SEAP was taken as 100 and the respective values were indicated relative to it. It was found that the activity, namely the expression level, was decreased as the SEAP gene was placed more downstream.

20       Figure 49 indicates microscopic photographs showing the expression of GFP in P1 cells co-expressing FHN.

25       Figure 50 indicates photographs showing the result of Western blot analysis of the extracts from cells infected with VSV-G pseudo-type SeV/ $\Delta$ F:GFP using anti-F antibody (anti-F), anti-HN antibody (anti-HN), and anti-Sendai virus antibody (anti-SeV).

30       Figure 51 indicates photographs showing GFP fluorescence from F- and HN-deficient cells infected with VSV-G pseudo-type SeV in the presence or absence of a neutralizing antibody (VGV antibody).

Figure 52 indicates photographs showing results of Western analysis for VSV-G pseudo-type Sendai viruses having F gene-deficient or F gene- and HN gene-deficient genome, which were fractionated by density gradient ultracentrifugation.

35       Figure 53 indicates photographs showing hemagglutination test

mediated with Sendai viruses having F gene-deficient genome, or VSV-G pseudo-type Sendai viruses having F gene-deficient or F gene- and HN gene-deficient genome.

Figure 54 indicates diagrams showing the specificity of infection to culture cells of Sendai virus having F gene-deficient genome or VSV-G pseudo-type Sendai virus.

Figure 55 indicates photographs showing the confirmation of the structures of NGF-expressing F-deficient Sendai virus (NGF/SeV/ $\Delta$ F).

Figure 56 is a diagram showing the activity of NGF expressed by the NGF-comprising cells infected with F-deficient SeV. With the initiation of culture, diluted supernatant of SeV-infected cells or NGF protein (control) was added to a dissociated culture of primary chicken dorsal root ganglion (DRG) neurons. After three days, the viable cells were counted by using mitochondrial reduction activity as an index (n=3). The quantity of culture supernatant added corresponded to 1000-fold dilution.

Figure 57 indicates photographs showing the activity of NGF expressed by the NGF-comprising cells infected with F-deficient SeV. With the initiation of culture, diluted supernatant of SeV-infected cells or NGF protein (control) was added to a dissociated culture of primary chicken dorsal root ganglion (DRG) neurons. After three days, the samples were observed under a microscope,

- A) control (without NGF);
- B) addition of NGF protein (10 ng/mL);
- C) addition of culture supernatant (100-fold diluted) of NGF/SeV infected cells;
- D) addition of culture supernatant (100-fold diluted) of NGF/SeV infected cells;
- E) addition of culture supernatant (100-fold diluted) of NGF/SeV/ $\Delta$ F infected cells, and;
- F) addition of culture supernatant (100-fold diluted) of NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP infected cells.

Figure 58 is a photograph showing moi of Ad-Cre and the expression level of F protein.

Figure 59 indicates photographs showing the expression of LLC-MK2/F by Adeno-Cre.

Figure 60 is a photograph showing the durability of expression over the passages.

Figure 61 indicates photographs showing the localization of F protein over the passages.

5 Figure 62 is a diagram showing the correlation between GFP-CIU and anti-SeV-CIU.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

10 The present invention is illustrated in detail below with reference to Examples, but is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Construction of F-deficient Sendai virus

<1> Construction of F-deficient SeV genomic cDNA and F-expressing plasmid

15 The full-length genomic cDNA of Sendai virus (SeV), pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) ("pSeV18<sup>+</sup> b(+)") is also referred to as "pSeV18<sup>+</sup>") was digested with SphI/KpnI, and the resulting fragment (14673 bp) was recovered and cloned into pUC18, which was named plasmid pUC18/KS. The F-disrupted  
20 site was constructed on this pUC18/KS. The F gene disruption was performed by the combined use of PCR-ligation method, and as a result, the ORF for the F gene (ATG-TGA=1698 bp) was removed; thus atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 1) was ligated to it to construct the F-deficient SeV genomic cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF). In PCR, a PCR product  
25 generated by using a primer pair (forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/SEQ ID NO: 2, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/SEQ ID NO: 3) was ligated upstream of F and another PCR product generated by using a primer pair (forward: 5'-atgcatgccggcagatga/SEQ ID NO: 4, reverse:  
30 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO: 5) was ligated downstream of the F gene at EcoT22I site. The resulting plasmid was digested with SacI and SalI, and then the fragment (4931 bp) spanning the region comprising the site where F is disrupted was recovered and cloned into pUC18 to generate pUC18/dFSS. This pUC18/dFSS was digested with  
35 DraIII. The resulting fragment was recovered and substituted with a DraIII fragment from the region comprising the F gene of pSeV18<sup>+</sup>;

and the ligation was carried out to generate plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF.

Further, in order to construct a cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) in which the EGFP gene has been introduced at the site where F was disrupted, the EGFP gene was amplified by PCR. To set the EGFP gene with a multiple of 6 (Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)), PCR was carried out with an NsiI-tailed primer (5'-atgcatatggtgatgcggttttggcagtac : SEQ ID NO: 6) for the 5' end and an NgoMIV-tailed primer (5'-Tgccggctattattacttgtacagctcgtc : SEQ ID NO: 7) for the 3' end. The PCR products were digested with restriction enzymes NsiI and NgoMIV, and then the fragment was recovered from the gel; the fragment was ligated at the site of pUC18/dFSS between NsiI and NgoMIV restriction enzyme sites where the disrupted F is located and the sequence was determined. A DraIII fragment comprising the EGFP gene was removed and recovered from the site, and substituted for a DraIII fragment in the region comprising the F gene of pSeV18<sup>+</sup>; then ligation was carried out to obtain plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP.

On the other hand, Cre-loxP-inducible expression plasmid for F gene expression was constructed by amplifying the SeV F gene by PCR, confirming the sequence, and inserting into the unique site SmaI of plasmid pCALNdlw (Arai et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121), in which the expression of gene products has been designed to be induced by Cre DNA recombinase, to obtain plasmid pCALNdLw/F.

<2> Preparation of helper cells inducing the expression of SeV-F protein

To recover infectious virus particles from F-deficient genome, a helper cell strain expressing SeV-F protein was established. The cell utilized was LLC-MK2 cell that is commonly used for the growth of SeV and is a cell strain derived from monkey kidney. The LLC-MK2 cells were cultured in MEM containing 10% heat-treated inactivated fetal bovine serum (FBS), sodium penicillin G (50 units/ml), and streptomycin (50 μg/ml) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> gas. Because SeV-F gene product is cytotoxic, the above-mentioned plasmid pCALNdLw/F designed to induce the expression of F gene product through Cre DNA recombinase was introduced into LLC-MK2 cells by calcium phosphate method (mammalian transfection kit (Stratagene)) according to the gene

transfer protocol.

10 µg of plasmid pCALNdLw/F was introduced into LLC-MK2 cells grown to be 40% confluent in a 10-cm plate, and the cells were cultured in 10 ml of MEM containing 10% FBS at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours in an incubator. After 24 hours, the cells were scraped off, and suspended in 10 ml medium; then the cells were plated on 5 dishes with 10-cm diameter (one plate with 5 ml; 2 plates with 2 ml; 2 plates with 0.2 ml) in MEM containing 10 ml of 10% FBS and 1200 µg/ml G418 (GIBCO-BRL) for the cultivation. The culture was continued for 14 days while the medium was changed at 2-day intervals, to select cell lines in which the gene has been introduced stably. 30 cell strains were recovered as G418-resistant cells grown in the medium by using cloning rings. Each clone was cultured to be confluent in 10-cm plates.

After the infection of each clone with recombinant adenovirus AxCANCre expressing Cre DNA recombinase, the cells were tested for the expression of SeV-F protein by Western blotting using anti-SeV-F protein monoclonal IgG (f236; J. Biochem. 123: 1064-1072) as follows.

After grown to be confluent in a 6-cm dish, each clone was infected with adenovirus AxCANCre at moi=3 according to the method of Saito et al., (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J Virol 72, 1115-1121 (1998)). After the infection, the cells were cultured for 3 days. The culture supernatant was discarded and the cells were washed twice with PBS buffer, scraped off with a scraper and were collected by centrifugation at 1500x g for five minutes.

The cells are kept at -80°C and can be thawed when used. The cells collected were suspended in 150 µl PBS buffer, and equal amount of 2x Tris-SDS-BME sample loading buffer (0.625 M Tris, pH 6.8, 5% SDS, 25% 2-ME, 50% glycerol, 0.025% BPB; Owl) was added thereto. The mixture was heat-treated at 98°C for 3 minutes and then used as a sample for electrophoresis. The sample (1x 10<sup>5</sup> cells/lane) was fractionated by electrophoresis in an SDS-polyacrylamide gel (Multi Gel 10/20, Daiichi Pure Chemicals). The fractionated proteins were transferred onto a PVDF transfer membrane (Immobilon-P transfer membranes; Millipore) by semi-dry blotting. The transfer was carried

out under a constant current of 1 mA/cm<sup>2</sup> for 1 hour onto the transfer membrane that had been soaked in 100% methanol for 30 seconds and then in water for 30 minutes.

5 The transfer membrane was shaken in a blocking solution containing 0.05% Tween20 and 1% BSA (BlockAce; Snow Brand Milk Products) for one hour, and then it was incubated at room temperature for 2 hours with an anti-SeV-F antibody (f236) which had been diluted 1000-folds with a blocking solution containing 0.05% Tween 20 and 1% BSA. The transfer membrane was washed 3 times in 20 ml of PBS-0.1%  
10 Tween20 while being shaken for 5 minutes and then it was washed in PBS buffer while being shaken for 5 minutes. The transfer membrane was incubated at room temperature for one hour in 10 ml of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Goat anti-mouse IgG; Zymed) diluted 2000-fold with the blocking solution containing 0.05%  
15 Tween 20 and 1% BSA. The transfer membrane was washed 3 times with 20 ml of PBS-0.1% Tween20 while being shaken for 5 minutes, and then it was washed in PBS buffer while being shaken for 5 minutes.

Detections were carried out for proteins cross-reacting to the anti-SeV-F antibody on the transfer membrane by chemiluminescence  
20 method (ECL western blotting detection reagents; Amersham). The result is shown in Figure 1. The SeV-F expression specific to AxCANCre infection was detected to confirm the generation of LLC-MK2 cells that induce expression of a SeV-F gene product.

One of the several resulting cell lines, LLC-MK2/F7 cell, was  
25 analyzed by flow cytometry with an anti-SeV-F antibody (Figure 2). Specifically,  $1 \times 10^5$  cells were precipitated by centrifugation at 15,000 rpm at 4°C for 5 minutes, washed with 200  $\mu$ l PBS, and allowed to react in PBS for FACS (NIKKEN CHEMICALS) containing 100-fold diluted anti-F monoclonal antibody (f236), 0.05% sodium azide, 2%  
30 FCS at 4°C for 1 hour in a dark place. The cells were again precipitated at 15,000 rpm at 4°C for 5 minutes, washed with 200  $\mu$ l PBS, and then allowed to react to FITC-labeled anti-mouse IgG (CAPPEL) of 1  $\mu$ g/ml on ice for 30 minutes. Then the cells were again washed with 200  $\mu$ l PBS, and then precipitated by centrifugation at 15,000  
35 rpm at 4°C for 5 minutes. The cells were suspended in 1 ml of PBS for FACS and then analyzed by using EPICS ELITE (Coulter) argon laser

at an excitation wavelength of 488 nm and at a fluorescence wavelength of 525 nm. The result showed that LLC-MK2/F7 exhibited a high reactivity to the antibody in a manner specific to the induction of SeV-F gene expression, and thus it was verified that SeV-F protein was expressed on the cell surface.

[Example 2] Confirmation of function of SeV-F protein expressed by helper cells

It was tested whether or not SeV-F protein, of which expression was induced by helper cells, retained the original protein function.

After plating on a 6-cm dish and grown to be confluent, LLC-MK2/F7 cells were infected with adenovirus AxCANCre at moi=3 according to the method of Saito et al. (described above). Then, the cells were cultured in MEM (serum free) containing trypsin (7.5 µg/ml; GIBCOBRL) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in an incubator for three days.

The culture supernatant was discarded and the cells were washed twice with PBS buffer, scraped off with a scraper, and collected by centrifugation at 1500 x g for five minutes. The cleavage of expressed F protein by trypsin was verified by Western blotting as described above (Figure 3). SeV-F protein is synthesized as F0 that is a non-active protein precursor, and then the precursor is activated after being digested into two subunits F1 and F2 by proteolysis with trypsin. LLC-MK2/F7 cells after the induction of F protein expression thus, like ordinary cells, continues to express F protein, even after being passaged, and no cytotoxicity mediated by the expressed F protein was observed as well as no cell fusion of F protein-expressing cells was observed. However, when SeV-HN expression plasmid (pCAG/SeV-HN) was transfected into the F-expressing cells and the cells were cultured in MEM containing trypsin for 3 days, cell fusion was frequently observed. The expression of HN on the cell surface was confirmed in an experiment using erythrocyte adsorption onto the cell surface (Hematoadsorption assay; Had assay) (Figure 4). Specifically, 1% chicken erythrocytes were added to the culture cells at a concentration of 1 ml/dish and the mixture was allowed to stand still at 4°C for 10 minutes. The cells were washed 3 times with PBS buffer, and then colonies of

erythrocytes on the cell surface were observed. Cell fusion was recognized for cells on which erythrocytes aggregated; cell fusion was found to be induced through the interaction of F protein with HN; and thus it was demonstrated that F protein, the expression of which was sustained in LLC-MK2/F7, retained the original function thereof.

[Example 3] Functional RNP having F-deficient genome and formation of virions

To recover virions from the deficient viruses, it is necessary to use cells expressing the deficient protein. Thus, the recovery of the deficient viruses was attempted with cells expressing the deficient protein, but it was revealed that the expression of F protein by the helper cell line stopped rapidly due to the vaccinia viruses used in the reconstitution of F-deficient SeV (Figure 5) and thus the virus reconstitution based on the direct supply of F protein from the helper cell line failed. It has been reported that replication capability of vaccinia virus is inactivated, but the activity of T7 expression is not impaired by the treatment of vaccinia virus with ultraviolet light of long wavelengths (long-wave UV) in the presence of added psoralen (PLWUV treatment) (Tsung et al., J Virol 70, 165-171, 1996). Thus, virus reconstitution was attempted by using PLWUV-treated vaccinia virus (PLWUV-VacT7). UV Stratalinker 2400 (Catalog NO. 400676 (100V); Stratagene, La Jolla, CA, USA) equipped with five 15-Watt bulbs was used for ultraviolet light irradiation. The result showed that the expression of F protein was inhibited from the F-expressing cells used in the reconstitution, but vaccinia was hardly grown in the presence of araC after lysate from the cells reconstituted with this PLWUV-VacT7 was infected to the helper cells, and it was also found that the expression of F protein by the helper cell line was hardly influenced. Further, this reconstitution of wild type SeV using this PLWUV-VacT7 enables the recovery of viruses from even  $10^3$  cells, whereas by previous methods, this was not possible unless  $10^5$  or more cells were there, and thus the efficiency of virus reconstitution was greatly improved. Thus, reconstitution of F-deficient SeV virus was attempted by using this method.

# <Reconstitution and amplification of F-deficient SeV virus>

The expression of GFP was observed after transfecting LLC-MK2 cells with the above-mentioned pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP in which the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene had been introduced as a reporter into the site where F had been disrupted according to the 6n rule in the manner as described below. It was also tested for the influence of the presence of virus-derived genes NP, P, and L that are three components required for the formation of RNP.

LLC-MK2 cells were plated on a 100-mm Petri-dish at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/dish and were cultured for 24 hours. After the culture was completed, the cells were treated with psoralen and ultraviolet light of long wavelengths (365 nm) for 20 minutes, and the cells were infected with recombinant vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) at room temperature for one hour (moi=2) (moi=2 to 3; preferably moi=2). After the cells were washed 3 times, plasmids pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) were respectively suspended in quantities of 12 μg, 4 μg, 2 μg, and 4 μg /dish in OptiMEM (GIBCO); SuperFect transfection reagent (1 μg DNA/5 μl SuperFect; QIAGEN) was added thereto; the mixtures were allowed to stand still at room temperature for 10 minutes; then they are added to 3 ml of OptiMEM containing 3% FBS; cells were added thereto and cultured. The same experiment was carried out using wild-type SeV genomic cDNA (pSeV(+)) (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) as a control instead of pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP. After culturing for 3 hours, the cells were washed twice with MEM containing no serum, and then cultured in MEM containing cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC, 40 μg/ml; Sigma) and trypsin (7.5 μg/ml; GIBCO) for 70 hours. These cells were harvested, and the pellet was suspended in OptiMEM ( $10^7$  cells/ml). After freeze-and-thaw treatment was repeated 3 times, the cells were mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer Mannheim) ( $10^6$  cells/25 μl DOSPER) and allowed to stand still at room temperature for 15 minutes. Then F-expressing LLC-MK2/F7 cell line ( $10^6$  cells /well in 12-well plate) was transfected, and the cells were cultured in MEM containing no serum (containing 40 μg/ml AraC and 7.5 μg/ml trypsin).

The result showed that the expression of GFP was recognized only when all the three components, NP, P, and L derived from the virus are present and the deficient virus RNP expressing foreign genes can be generated (Figure 6).

5 <Confirmation of F-deficient virions>

It was tested whether the functional RNP reconstituted by F-deficient genomic cDNA by the method as described above could be rescued by the F-expressing helper cells and form infective virions of F-deficient virus. Cell lysates were mixed with cationic liposome; the lysates were prepared by freeze/thaw from cells reconstituted under conditions in which functional RNP is formed (condition where pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L are transfected at the same time) or conditions under which functional RNP is not formed (conditions in which two plasmids, pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP and pGEM/NP, are transfected) as described above; the lysates were lipofected into F-expressing cells and non-expressing cells; the generation of virus particles was observed based on the expansion of the distribution of GFP-expressing cells. The result showed that the expansion of distribution of GFP-expressing cells was recognized only when the introduction to the F-expressing cells was carried out by using a lysate obtained under condition in which functional RNP is reconstituted (Figure 7). Furthermore, even in plaque assay, the plaque formation was seen only under the same conditions. From these results, it was revealed that functional RNPs generated from F-deficient virus genome were further converted into infective virus particles in the presence of F protein derived from F-expressing cells and the particles were released from the cells.

The demonstration of the presence of infective F-deficient virions in the culture supernatant was carried out by the following experiment. The lysate comprising the functional RNP constructed from the F gene deficient genome was lipofected to F-expressing cells as described in Example 2, and the culture supernatant was recovered. This culture supernatant was added to the medium of F-expressing cells to achieve the infection; on the third day, the culture supernatant was recovered and concurrently added to both F-expressing cells and cells that did not express F; and then the cells were cultured in

the presence or absence of trypsin for three days. In F-expressing cells, viruses were amplified only in the presence of trypsin (Figure 8). It was also revealed that non-infectious virus particles were released into the supernatant of cells that do not express F (in the bottom panel of Figure 9) or from F-expressing cells cultured in the absence of trypsin. A summary of the descriptions above is as follows: the growth of F-deficient GFP-expressing viruses is specific to F-expressing cells and depends on the proteolysis with trypsin. The titer of infective F-deficient Sendai virus thus grown ranged from 0.5x 10<sup>7</sup> to 1x 10<sup>7</sup> CIU/ml.

#### [Example 4] Analysis of F-deficient GFP-expressing virus

In order to confirm the genomic structure of virions recovered from F-deficient cDNA, viruses were recovered from the culture supernatant of the F-expressing cells, the total RNA was extracted and then Northern blot analysis was conducted by using F and HN as probes. The result showed that the HN gene was detectable, but the F gene was not detectable in the viruses harvested from the F-expressing cells, and it was clarified that the F gene was not present in the viral genome (Figure 10). Further, by RT-PCR GFP, it was confirmed that the gene was present in the deleted locus for F as shown in the construction of the cDNA (Figure 11) and that the structures of other genes were the same as those from the wild type. Based on the findings above, it was shown that no rearrangement of the genome had occurred during the virus reconstitution. In addition, the morphology of recovered F-deficient virus particles was examined by electron microscopy. Like the wild type virus, F-deficient virus particles had the helical RNP structure and spike-like structure inside (Figure 14). Further, the viruses were examined by immuno-electron microscopy with gold colloid-conjugated IgG (anti-F, anti-HN) specifically reacting to F or HN. The result showed that the spike-like structure of the envelope of the virus comprised F and HN proteins (Figure 12), which demonstrated that F protein produced by the helper cells was efficiently incorporated into the virions. The result will be described below in detail.

<Extraction of total RNA, Northern blot analysis, and RT-PCR>

Total RNA was extracted from culture supernatant obtained 3 days after the infection of F-expressing cell LLC-MK2/F7 with the viruses by using QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) according to the protocol. The purified total RNA (5 µg) was separated by electrophoresis in a 1% denaturing agarose gel containing formaldehyde, and then transferred onto a Hybond-N+ membrane in a vacuum blotting device (Amersham-Pharmacia). The prepared membrane was fixed with 0.05 M NaOH, rinsed with 2-fold diluted SSC buffer (Nacalai tesque), and then was subjected to pre-hybridization in a hybridization solution (Boehringer Mannheim) for 30 minutes; a probe for the F or HN gene prepared by random prime DNA labeling (DIG DNA Labeling Kit; Boehringer Mannheim) using digoxigenin (DIG)-dUTP (alkaline sensitive) was added thereto and then hybridization was performed for 16 hours. Then, the membrane was washed, and allowed to react to alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (anti-digoxigenin-AP); the analysis was carried out by using a DIG detection kit. The result showed that the HN gene was detectable but the F gene was not detectable in the viruses harvested from the F-expressing cells, and it was clarified that the F gene was not present in the viral genome (Figure 10).

Further, detailed analysis was carried out by RT-PCR. In the RT-PCR, first strand cDNA was synthesized from the purified virus RNA by using SUPERSRIPTII Preamplification System (Gibco BRL) according to the protocol; the following PCR condition was employed with LA PCR kit (TAKARA ver2.1): 94°C/3 min; 30 cycles for the amplification of 94°C/45 sec, 55°C/45 sec, 72°C/90 sec; incubation at 72°C for 10 minutes; then the sample was electrophoresed in a 2% agarose gel at 100 v for 30 minutes, the gel was stained with ethidium bromide for a photographic image. Primers used to confirm the M gene and EGFP inserted into the F-deficient site were forward 1: 5'-atcagagacctgcgacaatgc (SEQ ID NO: 8) and reverse 1: 5'-aagtcgtgctgcttcatgtgg (SEQ ID NO: 9); primers used to confirm EGFP inserted into the F-deficient site and the HN gene were forward 2: 5'-acaaccactacctgagcaccagtc (SEQ ID NO: 10) and reverse 2: 5'-gcctaacacatccagagatcg (SEQ ID NO: 11); and the junction between the M gene and HN gene was confirmed by using forward 3:

5'-acattcatgagtcagctcgc (SEQ ID NO: 12) and reverse 2 primer (SEQ ID NO: 11). The result showed that the GFP gene was present in the deficient locus for F as shown in the construction of the cDNA (Figure 11) and that the structures of other genes were the same as those from the wild type (Figure 13). From the findings shown above, it is clarified that no rearrangement of the genome had resulted during the virus reconstitution.

<Electron microscopic analysis with gold colloid-conjugated immunoglobulin>

The morphology of recovered F-deficient virus particles were examined by electron microscopy. First, culture supernatant of cells infected with the deficient viruses was centrifuged at 28,000 rpm for 30 minutes to obtain a virus pellet; then the pellet was re-suspended in 10-fold diluted PBS at a concentration of  $1 \times 10^9$  HAU/ml; one drop of the suspension was dropped on a microgrid with a supporting filter and then the grid was dried at room temperature; the grid was treated with PBS containing 3.7% formalin for 15 minutes for fixation and then pre-treated with PBS solution containing 0.1% BSA for 30 minutes; further, anti-F monoclonal antibody (f236) or anti-HN monoclonal antibody (Miura, N. et al., Exp. Cell Res. (1982) 141: 409-420) diluted 200-folds with the same solution was dropped on the grid and allowed to react under a moist condition for 60 minutes. Subsequently, the grid was washed with PBS, and then gold colloid-conjugated anti-mouse IgG antibody diluted 200-folds was dropped and allowed to react under a moist condition for 60 minutes. Subsequently, the grid was washed with PBS and then with distilled sterile water, and air-dried at room temperature; 4% uranum acetate solution was placed on the grid for the staining for 2 minutes and the grid was dried; the sample was observed and photographed in a JEM-1200EXII electron microscope (JEOL.). The result showed that the spike-like structure of the envelope of the virus comprised F and HN proteins (Figure 12), which demonstrated that F protein produced by the helper cells was efficiently incorporated into the virions. In addition, like the wild type virus, F-deficient virus particles had a helical RNP structure and a spike-like structure inside (Figure 14).

[Example 5] High-efficiency gene transfer to a variety of cells via F-deficient SeV vector *in vitro*

<Introduction into primary culture cells of rat cerebral cortex nerve cells>

Primary culture cells of rat cerebral cortex neurons were prepared and cultured as follows: an SD rat (SPF/VAF Crj: CD, female, 332 g, up to 9-week old; Charles River) on the eighteenth day of pregnancy was deeply anesthetized by diethyl ether, and then euthanized by bloodletting from axillary arteries. The fetuses were removed from the uterus after abdominal section. The cranial skin and bones were cut and the brains were taken out. The cerebral hemispheres were transferred under a stereoscopic microscope to a working solution DMEM (containing 5% horse serum, 5% calf serum and 10% DMSO); they were sliced and an ice-cold papain solution (1.5 U, 0.2 mg of cysteine, 0.2 mg of bovine serum albumin, 5 mg glucose, DNase of 0.1 mg/ml) was added thereto; the solution containing the sliced tissues was incubated for 15 minutes while shaking by inverting the vial every 5 minutes at 32°C. After it was verified that the suspension became turbid enough and the tissue sections became translucent, the tissue sections were crushed into small pieces by pipetting. The suspension was centrifuged at 1200 rpm at 32°C for 5 minutes, and then the cells were re-suspended in B27-supplemented neural basal medium (GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada). The cells were plated on a plate coated with poly-d-lysine (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, U.S.A.) at a density of  $1 \times 10^5$  cells/dish and then cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>.

After the primary culture of nerve cells from cerebral cortex ( $5 \times 10^5$ /well) were cultured for 5 days, the cells were infected with F-deficient SeV vector (moi=5) and further cultured for three days. The cells were fixed in a fixing solution containing 1% paraformaldehyde, 5% goat serum, and 0.5% Triton-X at room temperature for five minutes. Blocking reaction was carried out for the cells by using BlockAce (Snow Brand Milk Products) at room temperature for 2 hours, and then incubated with 500-fold diluted goat anti-rat microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (Boehringer) IgG at room

temperature for one hour. Further, the cells were washed three times with PBS(-) every 15 minutes and then were incubated with cys3-conjugated anti-mouse IgG diluted 100-folds with 5% goat serum/PBS at room temperature for one hour. Further, after the cells were washed three times with PBS(-) every 15 minutes, Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) was added to the cells; the cells, which had been double-stained with MAP-2 immuno staining and GFP fluorescence, were fluorescently observed by using a confocal microscope (Nippon Bio-Rad MRC 1024, Japan) and an inverted microscope Nikon Diaphot 300 equipped with excitation band-pass filter of 470-500-nm or 510-550-nm. The result showed that GFP had been introduced in nearly 100% nerve cells that were MAP2-positive (Figure 15).

#### <Introduction into normal human cells>

Normal human smooth-muscle cells, normal human hepatic cells, and normal human pulmonary capillary endothelial cells (Cell Systems) were purchased from DAINIPPON PHARMACEUTICAL and were cultured with SFM CS-C medium kit (Cell Systems) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> gas.

Human normal cells, such as normal human smooth-muscle cells (Figure 15, Muscle), normal human hepatic cells (Figure 15, Liver), and normal human pulmonary capillary endothelial cells (Figure 15, Lung), were infected with F-deficient SeV vector (m.o.i=5), and then the expression of GFP was observed. It was verified that the introduction efficiency was nearly 100% and the GFP gene was expressed at very high levels in all the cells (Figure 15).

#### <Introduction into mouse primary bone marrow cells>

Further, an experiment was conducted, in which mouse primary bone marrow cells were separated by utilizing lineage markers and were infected with F-deficient SeV vector. First, 5-fluorouracil (5-FU, Wako Pure Chemical Industries) was given to C57BL mouse (6-week old male) at a dose of 150 mg/kg by intraperitoneal injection (IP injection); 2 days after the administration, bone marrow cells were collected from the thighbone. The mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation using Lympholyte-M (Cedarlane). A mixture ( $3 \times 10^7$ ) of Streptavidin-magnetic beads (Pharmingen; Funakoshi), which had been coated with biotin-labeled anti-CD45R

(B220), anti-Ly6G (Gr-1), anti-Ly-76 (TER-119), anti-1 (Thy1.2), and anti-Mac-1, were added to the mononuclear cells ( $3 \times 10^6$  cells), and the resulting mixture was allowed to react at  $4^\circ\text{C}$  for 1 hour; a fraction, from which  $\text{Lin}^+$  cells had been removed by a magnet, was recovered ( $\text{Lin}^-$  cells) (Erlich, S. et al., Blood 1999. 93 (1), 80-86). SeV of  $2 \times 10^7$  HAU/ml was added to  $4 \times 10^5$  cells of  $\text{Lin}^-$  cell, and further recombinant rat SCF (100 ng/ml, BRL) and recombinant human IL-6 (100 U/ml) were added thereto. In addition, F-deficient SeV of  $4 \times 10^7$  HAU/ml was added to  $8 \times 10^5$  of total bone marrow cells, and GFP-SeV of  $5 \times 10^7$  HAU/ml was added to  $1 \times 10^6$  cells. GFP-SeV was prepared by inserting a PCR-amplified NotI fragment, which contains the green fluorescence protein (GFP) gene (the length of the structural gene is 717 bp) to which a transcription initiation (R1), a termination (R2) signal and an intervening (IG) sequence are added, at the restriction enzyme NotI-cleavage site of SeV transcription unit pUC18/T7HVJRz. DNA (+18) (Genes Cells, 1996, 1: 569-579). The reconstitution of viruses comprising the GFP gene was performed according to a known method (Genes Cells, 1996, 1: 569-579), using LLC-MK2 cells and embryonated egg, and then the viruses comprising the gene of interest were recovered. After a 48-hour culture following the infection with GFP-SeV, the cells were divided into two groups; one of them was allowed to react to phycoerythrin(PE)-labeled anti-CD117 (c-kit; Pharmingen) for 1 hour; the other was a control group. The cells were washed 3 times with PBS then were analyzed in a flow cytometer (EPICS Elite ESP; Coulter, Miami, FL).

The result showed that F-deficient SeV vector was also infected to bone marrow cells enriched by anti-c-kit antibody that has been utilized as a marker for blood primitive stem cells and the expression of the GFP gene was observed (Figure 16). The presence of infective particles in the culture supernatant was confirmed by determining the presence of GFP-expressing cells three days after the addition of cell culture supernatant treated with trypsin to LLC-MK2 cells. It was clarified that none of these cells released infective virus particles.

[Example 6] Vector administration into rat cerebral ventricle

Rats (F334/Du Crj, 6 week old, female, Charles River) were anesthetized by intraperitoneal injection of Nembutal sodium solution (Dainabot) diluted 10 folds (5 mg/ml) with physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). Virus was administrated using brain stereotaxic apparatus for small animals (DAVID KOPF). 20  $\mu$ l ( $10^8$  CIU) were injected at the point 5.2 mm toward bregma from interaural line, 2.0 mm toward right ear from lambda, 2.4 mm beneath the brain surface, using 30G exchangeable needles (Hamilton). A high level expression of GFP protein was observed in ventricle ependymal cells (Figure 17). Furthermore, in the case of F deficient SeV vector, the expression of GFP protein was observed only in ependymal cells or nerve cells around the injection site, which come into contact with the virus, and no lesion was found in this region. Abnormality in behavior or changes in body weight were not observed in the administered rats until dissection. After dissection, no lesion was found in the brain or in any of the tissues and organs analyzed, such as liver, lung, kidney, heart, spleen, stomach, intestine, and so forth.

[Example 7] Formation of F-less virus particles from F deficient SeV genome

<1>

F non-expressing LLC-MK2 cells and F expressing LLC-MK2 cells (LC-MK2/F7) were infected with F deficient SeV virus and cultured with (+) and without (-) trypsin. The result of HA assay of cell culture supernatant after 3 days is shown in Figure 18A. The culture supernatants were inoculated to embryonated chicken eggs, and the result of HA assay of chorioallantoic fluids after a 2 day-culture is shown in Figure 18B. "C" on top of panel indicates PBS used as the control group. The numbers indicated under "Dilution" indicates the dilution fold of the virus solution. Further, HA-positive chorioallantoic fluids in embryonated chicken eggs (lanes 11 and 12) was reinoculated into embryonated chicken eggs, and after culturing for two days, the chorioallantoic fluid was examined with HA assay (Figure 19C). As a result, F non-expressing cells or embryonated chicken eggs infected with F deficient SeV virus were found to be

HA-positive. However, viruses had not propagated after re-inoculation to embryonated chicken eggs, proving that the HA-positive virus solution does not have secondary infectivity.

<2>

5 The non-infectious virus solution amplified in F non-expressing cells was examined for the existence of virus particles. Northern blot analysis was performed for total RNA prepared from the culture supernatant of F expressing cells, HA-positive, non-infectious chorioallantoic fluid, and wildtype SeV by QIAamp viral RNA mini kit  
10 (QIAGEN), using the F gene and HN gene as probes. As a result, bands were detected for RNA derived from chorioallantoic fluid or virus in culture supernatant of F expressing cells when the HN gene was used as the probe, whereas no bands were detected when using the F gene probe (Figure 10). It was proven that the HA-positive,  
15 non-infectious fluid has non-infectious virus-like particles with an F deficient genome. Further, analysis of the HA-positive, non-infectious virus solution by an immunoelectron microscopy revealed the existence of virus particles, and the envelope of virion reacted to the antibody recognizing gold colloid-labeled HN protein,  
20 but not to the antibody recognizing gold colloid-labeled F protein (Figure 20). This result showed the existence of F-less virions, proving that the virus can be formed as a virion with HN protein alone, even without the existence of the F protein. It has been shown that SeV virion can form with F alone (Leyer, S. et al., J Gen. Virol 79,  
25 683-687 (1998)), and the present result proved for the first time that SeV virion can be formed with HN protein alone. Thus, the fact that F-less virions can be transiently produced in bulk in embryonated chicken eggs shows that virions packaging SeV F deficient RNP can be produced in bulk.

30 <3>

As described above, F-less virus virions transiently amplified in embryonated chicken eggs are not at all infective towards cells infected by the Sendai virus. To confirm that functional RNP structures are packaged in envelopes, F expressing cells and  
35 non-expressing cells were, mixed with cationic liposome (DOSPER, Boehringer mannheim) and transfected by incubation for 15 minutes

at room temperature. As a result, GFP-expressing cells were not observed at all when the cells are not mixed with the cationic liposome, whereas all cells expressed GFP when mixed with cationic liposome. In F non-expressing cells, GFP expression was seen only in individual cells and did not extend to adjacent cells, whereas in F expressing cells, GFP-expressing cells extended to form colonies (Figure 21). Therefore, it became clear that non-infectious virions transiently amplified in embryonated chicken eggs could express a gene when they are introduced into cells by methods such as transfection.

[Example 8] Reconstitution and amplification of the virus from FHN-deficient SeV genome

<Construction of FHN-deficient genomic cDNA>

To construct FHN-deficient SeV genomic cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN), pUC18/KS was first digested with EcoRI to construct pUC18/Eco, and then whole sequence from start codon of F gene to stop codon of HN gene (4866-8419) was deleted, then it was ligated at BsiwI site (cgtacg). After the sequence of FHN deleted region was confirmed by base sequencing, EcoRI fragment (4057 bp) was recovered from gels to substitute for EcoRI fragment of pUC18/KS to accomplish the construction. A KpnI/SphI fragment (14673 bp) comprising the FHN deleted region was recovered from gels to substitute for KpnI/SphI fragment of pSeV18<sup>+</sup> to obtain plasmid pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN.

On the other hand, the construction of FHN-deficient SeV cDNA introduced with GFP was accomplished as follows. SalI/XhoI fragment (7842 bp) was recovered from pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN, and cloned into pGEM11Z (Promega). The resultant plasmid was named as pGEM11Z/SXdFHN. To the FHN-deficient site of pGEM11Z/SXdFHN, PCR product with BsixI sites at both ends of ATG-TAA (846 bp) of d2EGFP (Clontech) was ligated by digesting with BsixI enzyme. The resultant plasmid was named as pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN-d2GFP.

<Establishment of FHN-deficient, protein co-expressing cell line>

The plasmid expressing F gene is identical to the one used for establishment of F deficient, protein co-expressing cell line, and plasmid expressing HN gene was similarly constructed, and the fragment comprising ORF of HN was inserted to unique SwaI site of pCALNdlw

(Arai et al., described above) to obtain plasmid named pCALNdLw/HN.

LLC-MK2 cells were mixed with same amount or different ratio of pCALNdLw/F and pCALNdLw/HN, to introduce genes using mammalian transfection kit (Stratagene), according to the manufacture's protocol. Cells were cloned after a three week-selection with G418. Drug resistant clones obtained were infected with a recombinant adenovirus (Ade/Cre, Saito et al., described above) (moi=10), which expresses Cre DNA recombinase. Then the cells were collected 3 days after inducing expression of F and HN protein after washing 3 times with PBS(-), and they were probed with monoclonal IgG of anti-SeV F protein and anti-SeV HN protein by using Western blotting method (Figure 22).

#### <Construction of pGEM/FHN>

F and HN fragments used for the construction of pCALNdLw/F and pCALNdLw/HN were cloned into pGEM4Z and pGEM3Z (Promega) to obtain pGEM4Z/F and pGEM3Z/HN, respectively. A fragment obtained by PvuII digestion of the region comprising T7 promoter and HN of pGEM3Z/HN was recovered, and ligated into the blunted site cut at the SacI unique site at the downstream of F gene of pGEM4Z/F. F and HN proteins were confirmed by Western blotting using anti-F or anti-HN monoclonal antibodies to be expressed simultaneously when they were aligned in the same direction.

#### <Reconstitution of FHN-deficient virus>

The reconstitution of FHN-deficient viruses (P0) was done in two ways. One was using the RNP transfection method as used in the reconstitution of F deficient virus, and the other was using T7 to supply co-expressing plasmids. Namely, under the regulation of T7 promoter, plasmids expressing F and HN proteins were constructed separately, and using those plasmids F and HN proteins were supplied for the reconstitution. In both methods, reconstituted viruses were amplified by FHN coexpressing cells. FHN-deficient, GFP-expressing SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN-d2GFP), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/FHN were mixed in the ratio of 12 μg/10 cm dish, 4 μg/10 cm dish, 2 μg/10 cm dish, 4 μg/10 cm dish, and 4 μg/10 cm dish (final total volume, 3 ml/10 cm dish) for gene introduction into LLC-MK2 cells in the same way as F deficient SeV reconstitution described above. Three hours

after the gene introduction, media was changed to MEM containing AraC (40 µg/ml, SIGMA) and trypsin (7.5 µg/ml, GIBCO), and cultured further for 3 days. Observation was carried out by fluorescence stereoscopic microscope 2 days after gene introduction. The effect of pGEM/FHN addition was analyzed, and the virus formation was confirmed by the spread of GFP-expressing cells. As a result, a spread of GFP-expressing cells was observed when pGEM/FHN was added at reconstitution, whereas the spread was not observed when pGEM/FHN was not added, and the GFP expression was observed only in a single cell (Figure 23). It is demonstrated that the addition at FHN protein reconstitution caused virus virion formation. On the other hand, in the case of RNP transfection, virus recovery was successfully accomplished in FHN expressing cells of P1, as in the case of F deficiency (Figure 24, upper panel).

Virus amplification was confirmed after infection of FHN-deficient virus solution to cells induced to express FHN protein 6 hours or more after Ade/Cre infection (Figure 24, lower panel).

Solution of viruses reconstituted from FHN-deficient GFP-expressing SeV CDNA was infected to LLC-MK2, LLC-MK2/F, LLC-MK2/HN and LLC-MK2/FHN cells, and cultured with or without the addition of trypsin. After 3 days of culture, spread of GFP protein expressing cells was analyzed. As a result, spread of GFP was observed only in LLC-MK2/FHN, confirming that the virus solution can be amplified specifically by FHN co-expression and in a trypsin dependent manner (Figure 25).

To confirm FHN-deficient viral genome, culture supernatant recovered from LLC-MK2/FHN cells was centrifuged, and RNA was extracted using QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN), according to manufacturer's protocol. The RNA was used for template synthesis of RT-PCR using Superscript Preamplification System for first Strand Synthesis (GIBCO BRL), and PCR was performed using TAKARA Z-Taq (Takara). F-deficient virus was used as a control group. PCR primer sets were selected as combination of M gene and GFP gene, or combination of M gene and L gene (for combination of M gene and GFP gene (M-GFP), forward: 5'-atcagagacctgcgacaatgc / SEQ ID NO: 13, reverse: 5'-aagtcgtgctgcttcatgtgg / SEQ ID NO: 14; for combination

of M gene and L gene (M-L), forward: 5'-gaaaaacttagggataaagtc / SEQ ID NO: 15, reverse: 5'-gttatctccgggatggtgc / SEQ ID NO: 16). As a result, specific bands were obtained for both F-deficient and FHN-deficient viruses at RT conditions when using M and GFP genes as primers. In the case of using M and L genes as primers, the bands with given size comprising GFP were detected for FHN deficient sample, and lengthened bands with the size comprising HN gene were detected for F deficient one. Thus, FHN deficiency in genome structure was proven (Figure 26).

On the other hand, FHN-deficient virus was infected to F expressing cells similarly as when using the F-deficient virus, and culture supernatant was recovered after 4 days to perform infection experiment toward LLC-MK2, LLC-MK2/F, and LLC-MK2/FHN. As a result, GFP expression cell was not observed in any infected cell, showing that the virus has no infectiousness to these cells. However, it has been already reported that F protein alone is enough to form virus particles (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) and that asialoglycoprotein receptor (ASG-R) mediates specific infection to hepatocytes (Spiegel et al., J. Virol 72, 5296-5302, 1998). Thus, virions comprising FHN-deficient RNA genome, with virus envelope configured with only F protein may be released to culture supernatant of F expressing cells. Therefore, culture supernatant of F expressing cells infected with FHN-deficient virus was recovered, and after centrifugation, RNA was extracted as described above and analyzed by RT-PCR by the method described above. As a result, the existence of RNA comprising FHN-deficient genome was proved as shown in Figure 27.

Western blotting analysis of virus virion turned into pseudotype with VSV-G clearly shows that F and HN proteins are not expressed. It could be said that herein, the production system of FHN-deficient virus virions was established.

Moreover, virions released from F protein expressing cells were overlaid on FHN expressing or non-expressing LLC-MK2 cells with or without mixing with a cationic liposome (50  $\mu$ l DOSPER/500  $\mu$ l/well). As a result, spread of GFP-expressing cells was observed when overlaid as mixture with DOSPER, while HN-less virion only has no

infectiousness at all, not showing GFP-expressing cells, as was seen in the case of F-less particles described above. In FHN non-expressing cells GFP expressing cell was observed, but no evidence of virus re-formation and spread was found.

5        These virus-like particles recovered from F expressing cells can infect cells continuously expressing ASG-R gene, ASG-R non-expressing cells, or hepatocytes, and whether the infection is liver-specific or ASG-R specific can be examined by the the method of Spiegel et al.

10        [Example 9] Application of deficient genome RNA virus vector

1. F-deficient RNP amplified in the system described above is enclosed by the F-less virus envelope. The envelope can be introduced into cells by adding any desired cell-introducing capability to the  
15 envelope by chemical modification methods and such, or by gene introducing reagents or gene guns or the like (RNP transfection, or RNP injection), and the recombinant RNA genome can replicate and produce proteins autonomously and continuously in the cells.

2. A vector capable of specific targeting can be produced, when  
20 intracellular domain of HN is left as-is, and the extracellular domain of HN is fused with ligands capable of targeting other receptors in a specific manner, and recombinant gene capable of producing chimeric protein is incorporated into viral-genome. In addition, the vector can be prepared in cells producing the recombinant protein. These  
25 vectors can be applicable to gene therapy, as vaccines, or such.

3. Since the reconstitution of SeV virus deficient in both FHN has been successfully accomplished, targeting vector can be produced by introducing targeting-capable envelope chimeric protein gene into FHN deletion site instead of the GFP gene, reconstituting it by the  
30 same method as in the case of FHN-deficient vector, amplifying the resultant once in FHN-expressing cells, infecting the resultant to non-expressing cells, and recovering virions formed with only the targeting-capable chimeric envelope protein transcribed from the viral-genome.

35        4. A mini-genome of Sendai virus and a virion formed with only F protein packaging mini-genome by introducing NP, P, L and F gene to

cells have been reported (Leyer et al., J Gen. Virol 79, 683-687, 1998). A vector in which murine leukemia virus is turned into pseudo-type by Sendai F protein has also been reported (Spiegel et al., J. Virol 72, 5296-5302, 1998). Also reported so far is the specific targeting of trypsin-cleaved F-protein to hepatocytes mediated by ASG-R (Bitzer et al., J. Virol. 71, 5481-5486, 1997). The systems in former reports are transient particle-forming systems, which make it difficult to continuously recover vector particles. Although Spiegel et al. has reported retrovirus vector turned into pseudo-type by Sendai F protein, this method carries intrinsic problems like the retrovirus being able to introduce genes to only mitotic cells. The virus particles recovered in the present invention with a FHN co-deficient SeV viral-genome and only the F protein as the envelope protein are efficient RNA vectors capable of autonomous replication in the cytoplasm irrespective of cell mitosis. They are novel virus particles, and is a practical system facilitating mass production.

[Example 10] Virus reconstitution and amplification from FHN-deficient SeV genome

The techniques of reconstitution of infectious virus particles from cDNA that cloned the viral genome has been established for many single strand minus strand RNA viruses such as the Sendai virus, measles virus.

In most of the systems, reconstitution is carried out by introducing plasmids introduced with cDNA, NP, P, and L genes at the downstream of T7 promoter into cells and expressing cDNA and each gene using T7 polymerase. To supply T7 polymerase, recombinant vaccinia virus expressing T7 polymerase is mainly used.

T7 expressing vaccinia virus can express T7 polymerase efficiently in most cells. Although, because of vaccinia virus-induced cytotoxicity, infected cells can live for only 2 or 3 days. In most cases, rifampicin is used as an anti-vaccinia reagent. In the system of Kato et al. (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)), AraC was used together with rifampicin for inhibiting vaccinia virus growth to a minimum level, and efficient reconstitution of Sendai virus.

However, the reconstitution efficiency of minus strand RNA virus represented by Sendai virus is several particles or less in  $1 \times 10^5$  cells, far lower than other viruses such as retroviruses. Cytotoxicity due to the vaccinia virus and the complex reconstitution process (transcribed and translated protein separately attaches to bare RNA to form RNP-like structure, and after that, transcription and translation occurs by a polymerase) can be given as reasons for this low reconstitution efficiency.

In addition to the vaccinia virus, an adeno virus system was examined as a means for supplying T7 polymerase, but no good result was obtained. Vaccinia virus encodes RNA capping enzyme functioning in cytoplasm as the enzyme of itself in addition to T7 polymerase and it is thought that the enzyme enhances the translational efficiency by capping the RNA transcribed by T7 promoter in the cytoplasm. The present invention tried to enhance the reconstitution efficiency of Sendai virus by treating vaccinia virus with Psoralen-Long-Wave-UV method to avoid cytotoxicity due to the vaccinia virus.

By DNA cross-linking with Psoralen and long-wave ultraviolet light, the state in which the replication of virus with DNA genome is inhibited, without effecting early gene expression in particular, can be obtained. The notable effect seen by inactivation of the virus in the system may be attributed to that vaccinia virus having a long genome (Tsung, K. et al., J Virol 70, 165-171 (1996)).

In the case of wildtype virus that can propagate autonomously, even a single particle of virus formed by reconstitution makes it possible for Sendai virus to be propagated by inoculating transfected cells to embryonated chicken eggs. Therefore, one does not have to consider of the efficiency of reconstitution and the residual vaccinia virus seriously.

However, in the case of reconstitution of various mutant viruses for researching viral replication, particle formation mechanism, and so on, one may be obligated to use cell lines expressing a protein derived from virus and such, not embryonated chicken eggs, for propagation of the virus. Further, it may greatly possible that the mutant virus or deficient virus propagates markedly slower than the

wild type virus.

To propagate Sendai virus with such mutations, transfected cells should be overlaid onto cells of the next generation and cultured for a long period. In such cases, the reconstitution efficiency and residual titer of vaccinia virus may be problematic. In the present method, titer of surviving vaccinia virus was successfully decreased while increasing reconstitution efficiency.

Using the present method, a mutant virus that could have not been ever obtained in the former system using a non-treated vaccinia virus was successfully obtained by reconstitution (F, FHN-deficient virus). The present system would be a great tool for the reconstitution of a mutant virus, which would be done more in the future. Therefore, the present inventors examined the amount of Psoralen and ultraviolet light (UV), and the conditions of vaccinia virus inactivation.

#### <Experiment>

First, Psoralen concentration was tested with a fixed irradiation time of 2 min. Inactivation was tested by measuring the titer of vaccinia virus by plaque formation, and by measuring T7 polymerase activity by pGEM-luci plasmid under the control of T7 promoter and mini-genome of Sendai virus. The measurement of T7 polymerase activity of mini-genome of Sendai virus is a system in which cells are transfected concomitantly with plasmid of mini-genome of Sendai virus and pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L plasmids, which express NP-, P-, and L-protein of Sendai virus by T7, to examine transcription of luciferase enzyme protein by RNA polymerase of Sendai virus after the formation of ribonucleoprotein complex.

After the 2 min UV irradiation, decrease in titer of vaccinia virus depending on psoralen concentration was seen. However, T7 polymerase activity was unchanged for a Psoralen concentration up to 0, 0.3, and 1  $\mu\text{g/ml}$ , but decreased approximately to one tenth at 10  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 28).

Furthermore, by fixing Psoralen concentration to 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , UV irradiation time was examined. In accordance with the increase of irradiation time, the titer of vaccinia virus was decreased, although no effect on T7 polymerase activity was found up to a 30 min irradiation.

In this case, under the conditions of 0.3 µg/ml and 30 min irradiation, titer could be decreased down to 1/1000 without affecting T7 polymerase activity (Figure 29).

5 However, in vaccinia virus with a decreased titer of 1/1000, CPE 24 hours after infection at moi=2 calibrated to pretreatment titer (moi=0.002 as residual titer after treatment) was not different from that of non-treated virus infected at moi=2 (Figure 30).

Using vaccinia virus treated under the conditions described above, the efficiency of reconstitution of Sendai virus was examined.  
 10 Reconstitution was carried out by the procedure described below, modifying the method of Kato et al. mentioned above. LLC-MK2 cells were seeded onto 6-well microplates at  $3 \times 10^5$  cells/well, and after an overnight culture, vaccinia virus was diluted to the titer of  $6 \times 10^5$  pfu/100 µl calibrated before PLWUV treatment, and infected to  
 15 PBS-washed cells. One hour after infection, 100 µl of OPTI-MEM added with 1, 0.5, 1, and 4 µg of plasmid pGEM-NP, P, L, and cDNA, respectively, was further added with 10 µl Superfect (QIAGEN) and left standing for 15 min at room temperature, and after adding 1 ml OPTI-MEM (GIBCO) (containing Rif. and AraC), was overlaid onto the cells.

20 Two, three and four days after transfection, cells were recovered, centrifuged, and suspended in 300 µl/well of PBS. 100 µl of cell containing solution made from the suspension itself, or by diluting the suspension by 10 or 100 folds, was inoculated to embryonated chicken eggs at day 10 following fertilization, 4 eggs  
 25 for each dilution ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ , and  $1 \times 10^3$  cells, respectively). After 3 days, allantoic fluid was recovered from the eggs and the reconstitution of virus was examined by HA test (Table 1). Eggs with HA activity was scored as 1 point, 10 points and 100 points for eggs inoculated with  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ , and  $1 \times 10^3$  cells, respectively, to  
 30 calculate the Reconstitution Score (Figure 31). The formula is as shown in Table 1.

Table 1. Effect of the duration of UV treatment of vaccinia virus on reconstitution efficiency of Sendai virus

Effect of the duration of UV treatment of vaccinia virus  
on reconstitution efficiency of Sendai virus

The number of inoculated cells	Score (a)	The number of HA-positive eggs (b)											
		2d						3d					
		0'	15'	20'	30'	0'	15'	20'	30'	0'	15'	20'	30'
$10^5$	1 (a1)	1	2	4	4	0	2	4	4	1	3	4	4
$10^4$	10 (a2)	0	1	3	2	0	2	3	4	0	0	4	0
$10^3$	100 (a3)	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
Reconsti- tution Score	(a1+a2+a3) x b	1	12	24	124	0	122	34	244	1	3	44	4

$$\text{Reconstitution Score} = (a1+a2+a3) \times b$$

Also, residual titers of vaccinia virus measured at 2, 3, and 4 days after transfection within cells were smaller in the treated group in proportion to the titer given before transfection (Figure 32).

By inactivating vaccinia virus by PLWUV, titer could be decreased down to 1/1000 without affecting T7 polymerase activity. However, CPE derived from vaccinia virus did not differ from that of non-treated virus with a 1000 fold higher titer as revealed by microscopic observations.

Using vaccinia virus treated with the condition described above for reconstitution of Sendai virus, reconstitution efficiency

increased from ten to hundred folds (Figure 31). At the same time, residual titer of vaccinia virus after transfection was not 5 pfu/10<sup>5</sup> cells or more. Thus, the survival of replicable vaccinia virus was kept at 0.005% or less.

5

[Example 11] Construction of pseudotype Sendai virus

<1> Preparation of helper cells in which VSV-G gene product is induced

Because VSV-G gene product has a cytotoxicity, stable transformant was created in LLC-MK2 cells using plasmid pCALNdLG (Arai T. et al., J. Virology 72 (1998) p1115-1121) in which VSV-G gene product can be induced by Cre recombinase. Introduction of plasmid into LLC-MK2 cells was accomplished by calcium phosphate method (CalPhosTMMammalian Transfection Kit, Clontech), according to accompanying manual.

Ten micrograms of plasmid pCALNdLG was introduced into LLC-MK2 cells grown to 60% confluency in a 10 cm culture dish. Cells were cultured for 24 hours with 10 ml MEM-FCS 10% medium in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. After 24 hours, cells were scraped off and suspended in 10 ml of medium, and then using five 10 cm culture dishes, 1, 2 and 2 dishes were seeded with 5 ml, 2 ml and 0.5 ml, respectively. Then they were cultured for 14 days in 10 ml MEM-FCS 10% medium containing 1200 µg/ml G418 (GIBCO-BRL) with a medium change on every other day to select stable transformants. Twenty-eight clones resistant to G418 grown in the culture were recovered using cloning rings. Each clone was expanded to confluency in a 10 cm culture dish.

For each clone, the expression of VSV-G was examined by Western blotting described below using anti-VSV-G monoclonal antibody, after infection with recombinant adenovirus AxCANCre containing Cre recombinase.

Each clone was grown in a 6 cm culture dish to confluency, and after that, adenovirus AxCANCre was infected at MOI=10 by the method of Saito et al. (see above), and cultured for 3 days. After removing the culture supernatant, the cells were washed with PBS, and detached from the culture dish by adding 0.5 ml PBS containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and incubating at 37°C, 5 min. After suspending in 3 ml PBS, the cells were collected

by centrifugation at 1500x g, 5 min. The cells obtained were resuspended in 2 ml PBS, and then centrifuged again at 1500x g, 5 min to collect cells.

The cells can be stored at -20°C, and can be used by thawing according to needs. The collected cells were lysed in 100 µl cell lysis solution (RIPA buffer, Boehringer Mannheim), and using whole protein of the cells (1x 10<sup>5</sup> cells per lane) Western blotting was performed. Cell lysates were dissolved in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer (buffer comprising 6 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) and subjected as samples for electrophoresis after heating at 95°C, 5 min. The samples were separated by electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel (Multigel 10/20, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd), and the separated protein was then transferred to transfer membrane (Immobilon-P TransferMembranes, Millipore) by semi-dry blotting method. Transfer was carried out using transfer membrane soaked with 100% methanol for 20 sec and with water for 1 hour, at a 1 mA/cm<sup>2</sup> constant current for 1 hour.

The transfer membrane was shaken in 40 ml of blocking solution (Block-Ace, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) for 1 hour, and washed once in PBS.

The transfer membrane and 5 ml anti-VSV-G antibody (clone P4D4, Sigma) diluted 1/1000 by PBS containing 10% blocking solution were sealed in a vinyl-bag and left to stand at 4°C.

The transfer membrane was soaked twice in 40 ml of PBS-0.1% Tween 20 for 5 min, and after the washing, soaked in PBS for 5 min for washing.

The transfer membrane and 5 ml of anti-mouse IgG antibody labeled with peroxidase (anti-mouse immunoglobulin, Amersham) diluted to 1/2500 in PBS containing 10% blocking solution were sealed in vinyl-bag and were shaken at room temperature for 1 hour.

After shaking, the transfer membrane was soaked twice in PBS-0.1% Tween 20 for 5 min, and after the washing, soaked in PBS for 5 min for washing.

The detection of proteins on the membrane crossreacting with anti-VSV-G antibody was carried out by the luminescence method (ECL Western blotting detection reagents, Amersham). The result is shown

in Figure 33. Three clones showed AxCANCre infection specific VSV-G expression, confirming the establishment of LLC-MK2 cells in which VSV-G gene product can be induced.

One clone among the clones obtained, named as LLCG-L1, was subjected to flow cytometry analysis using anti-VSV antibody (Figure 34). As a result, reactivity with antibody specific to VSV-G gene induction was detected in LLCG-L1, confirming that VSV-G protein is expressed on the cell surface.

<2> Preparation of pseudotype Sendai virus comprising a genome deficient in the F gene using helper cells

Sendai virus comprising a genome deficient in F gene was infected to VSV-G gene expressing cells, and whether production of pseudotype virus with VSV-G as capsid can be seen or not was examined using F-deficient Sendai virus comprising GFP gene described in the examples above, and the expression of GFP gene as an index. As a result, in LLCG-L1 without infection of recombinant adenovirus AxCANCre comprising Cre recombinase, viral gene was introduced by F-deficient Sendai virus infection and GFP-expressing cells were detected, although the number of expressing cells was not increased. In VSV-G induced cells, chronological increase of GFP-expressing cells was found. When 1/5 of supernatants were further added to newly VSV-G induced cells, no gene introduction was seen in the former supernatant, while the increase of GFP-expressing cells as well as gene introduction were found in the latter supernatant. Also, in the case that supernatant from latter is added to LLCG-L1 cells without induction of VSV-G, gene was introduced, but increase of GFP-expressing cells was not seen. Taken together, virus propagation specific to VSV-G expressing cells was found, and pseudotype F-deficient virus formation with VSV-G was found.

<3> Evaluation of conditions for producing pseudotype Sendai virus with F gene-deficient genome

A certain amount of pseudotype Sendai viruses with F gene-deficient genomes was infected changing the amount of AxCANCre infection (MOI=0, 1.25, 2.5, 5, and 10) and culture supernatant was recovered at day 7 or day 8. Then, the supernatant was infected to

the cells before and after induction of VSV-G, and after 5 days, number of cells expressing GFP was compared to see the effect of amount of VSV-G gene expression. As a result, no virus production was found at MOI=0 and maximum production was found at MOI=10 (Figure 35). In addition, when time course of virus production was analyzed, the production level started to increase from day 5 or after, persisting to day 8 (Figure 36). The measurement of virus titer was accomplished by calculating the number of particles infected to cells in the virus solution (CIU), by counting GFP-expressing cells 5 days after infection of serially (10 fold each) diluted virus solutions to cells not yet induced with VSV-G. As a result, the maximal virus production was found to be  $5 \times 10^5$  CIU/ml.

<4> Effect of anti-VSV antibody on infectiousness of pseudotype Sendai virus with F gene-deficient genome

As to whether pseudotype Sendai virus with F gene-deficient genome obtained by using VSV-G expressing cells comprises VSV-G protein in the capsid, the neutralizing activity of whether infectiousness will be affected was evaluated using anti-VSV antibody. Virus solution and antibody were mixed and left standing at room temperature for 30 min, and then infected to LLCG-L1 cells without VSV-G induction. On day 5, gene-introducing capability was examined by the existence of GFP-expressing cells. As a result, perfect inhibition of infectiousness was seen by the anti-VSV antibody, whereas in Sendai virus with F gene-deficient genome having the original capsid, the inhibition was not seen (Figure 37). Therefore, it was clearly shown that the present virus obtained is a pseudotype Sendai virus comprising VSV-G protein in its capsid, in which infectiousness of the virus can be specifically inhibited by an antibody.

<5> Confirmation of pseudotype Sendai virus's possession of F-deficient genome

Western blotting analysis of cell extract of infected cells was carried out to examine if the present virus propagated in cells expressing VSV-G gene is the F-deficient type. Western analysis was accomplished by the method described above. As the primary antibodies, anti-Sendai virus polyclonal antibody prepared from

rabbit, anti-F protein monoclonal antibody prepared from mouse, and anti-HN protein monoclonal antibody prepared from mouse were used. As the secondary antibodies, anti-rabbit IgG antibody labeled with peroxidase in the case of anti-Sendai virus polyclonal antibody, and anti-mouse IgG antibody labeled with peroxidase in the case of anti-F protein monoclonal antibody and anti-HN protein monoclonal antibody, were used. As a result, F protein was not detected, whereas protein derived from Sendai virus and HN protein were detected, confirming it is F-deficient type.

#### 10 <6> Preparation of pseudotype Sendai virus with F and HN gene-deficient genome by using helper cells

Whether the production of pseudotype virus with VSV-G in its capsid is observed after the infection of Sendai virus with F and HN gene-deficient genome to LLCG-L1 cells expressing VSV-G gene was analyzed using GFP gene expression as the indicator and F and HN gene-deficient Sendai virus comprising GFP gene described in examples above, by a similar method as described in examples above. As a result, virus propagation specific to VSV-G expressing cells was observed, and the production of F and HN deficient Sendai virus that is a pseudotype with VSV-G was observed (Figure 38). The measurement of virus titer was accomplished by calculating the number of particles infected to cells in the virus solution (CIU), by counting GFP-expressing cells 5 days after infection of serially (10 fold each) diluted virus solutions to cells not yet induced with VSV-G. As a result, the maximal virus production was  $1 \times 10^6$  CIU/ml.

#### 25 <7> Confirmation of pseudotype Sendai virus's possession of F and HN deficient genome

Western blotting of proteins in cell extract of infected cells was carried out to analyze whether the present virus propagated in VSV-G expressing cells are the F and HN deficient type. As a result, F and HN proteins were not detected, whereas proteins derived from Sendai virus were detected, confirming that it is F and HN deficient type (Figure 39).

#### 35 [Example 12] Analysis of virus reconstitution method <Conventional method>

LLC-MK2 cells were seeded onto 100 mm culture dishes at  $5 \times 10^6$  cells/dish. After a 24 hour culture, the cells were washed once with MEM medium without serum, and then infected with recombinant vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 1986) (vTF7-3) at room temperature for 1 hour (moi=2) (moi=2 to 3, preferably moi=2 is used). The virus used herein, was pretreated with 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  psoralen and long-wave ultraviolet light (365 nm) for 5 min. Plasmids pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579(1996)) were suspended in Opti-MEM medium (GIBCO) at ratio of 12  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , and 4  $\mu\text{g}/\text{dish}$ , respectively. Then, SuperFect transfection reagent (1  $\mu\text{g}$  DNA/5  $\mu\text{l}$ , QIAGEN) was added and left to stand at room temperature for 15 min and 3 ml Opti-MEM medium containing 3% FBS was added. Thereafter, the cells were washed twice with MEM medium without serum, and DNA-SuperFect mixture was added. After a 3 hr culture, cells were washed twice with MEM medium without serum, and cultured 70 hours in MEM medium containing 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma). Cells and culture supernatant were collected as P0-d3 samples. Pellets of P0-d3 were suspended in Opti-MEM medium ( $10^7$  cells/ml). They were freeze-thawed three times and then mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer Mannheim) ( $10^6$  cells/25  $\mu\text{l}$  DOSPER) and left to stand at room temperature for 15 min. Then, F expressing LLC-MK2/F7 cells were transfected with the mixture ( $10^6$  cells/well in 24-well plate) and cultured with MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC and 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trypsin). Culture supernatants were recovered on day 3 and day 7 and were designated as P1-d3 and P1-d7 samples.

<Envelope plasmid + F expressing cells overlaying method>

Transfection was carried out similarly as described above, except that 4  $\mu\text{g}/\text{dish}$  envelope plasmid pGEM/FHN was added. After a 3 hr culture, cells were washed twice with MEM medium without serum, and cultured 48 hours in MEM medium containing 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  trypsin. After removing the culture supernatant, cells were overlaid with 5 ml cell suspension solution of a 100 mm dish of F expressing LLC-MK2/F7 cells suspended with MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AraC

and 7.5 µg/ml trypsin). After a 48 hr culture, cells and supernatants were recovered and designated as P0-d4 samples. Pellets of P0-d4 samples were suspended in Opti-MEM medium ( $2 \times 10^7$  cells/ml) and freeze-thawed three times. Then F expressing LLC-MK2/F7 cells were overlaid with the suspension ( $2 \times 10^6$  cells/well, 24-well plate) and cultured in MEM medium without serum (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin). Culture supernatants were recovered on day 3 and day 7 of the culture, designated as P1-d3 and P1-d7 samples, respectively. As a control, experiment was carried out using the same method as described above, but without overlaying and adding only the envelope plasmid.

<CIU (Cell Infectious Units) measurement by counting GFP-expressing cells (GFP-CIU)>

LLC-MK2 cells were seeded onto a 12-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/well, and after 24 hr culture the wells were washed once with MEM medium without serum. Then, the cells were infected with 100 µl/well of appropriately diluted samples described above (P0-d3 or P0-d4, P1-d3, and P1-d7), in which the samples were diluted as containing 10 to 100 positive cells in  $10 \text{ cm}^2$ . After 15 min, 1 ml/well of serum-free MEM medium was added, and after a further 24 hr culture, cells were observed under fluorescence microscopy to count GFP-expressing cells.

<Measurement of CIU (Cell Infectious Units)>

LLC-MK2 cells were seeded onto a 12-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/dish and after a 24 hr culture, cells were washed once with MEM medium without serum. Then, the cells were infected with 100 µl/well of samples described above, in which the virus vector contained is designated as SeV/ΔF-GFP. After 15 min, 1 ml/well of MEM medium without serum was added and cultured for a further 24 hours. After the culture, cells were washed with PBS (-) three times and were dried up by leaving standing at room temperature for approximately 10 min to 15 min. To fix cells, 1 ml/well acetone was added and immediately removed, and then the cells were dried up again by leaving to stand at room temperature for approximately 10 min to 15 min. 300 µl/well of anti-SeV polyclonal antibody (DN-1) prepared from rabbit, 100-fold diluted with PBS (-) was added to cells were

and incubated for 45 min at 37°C. Then, they were washed three times with PBS (-) and 300 µl/well of anti-rabbit IgG (H+L) fluorescence-labeled second antibody (Alexa™568, Molecular Probes), 200-fold diluted with PBS (-) was added and incubated for 45 min at 37°C. After washing with PBS (-) three times, the cells were observed under fluorescence microscopy (Emission: 560 nm, Absorption: 645 nm filters, Leica) to find fluorescent cells (Figure 40).

As controls, samples described above (SeV/ΔF-GFP) were infected at 100 µl/well, and after 15 min 1 ml/well of MEM without serum was added, and after a 24 hr culture, cells were observed under fluorescence microscopy (Emission: 360 nm, Absorption: 470 nm filters, Leica) to find GFP-expressing cells, without the process after the culture.

[Example 13] Evaluation of the most suitable PLWUV (Psoralen and Long-Wave UV light) treatment conditions for vaccinia virus (vTF7-3) for increasing reconstitution efficiency of deficient-type Sendai virus vector

LLC-MK2 cells were seeded onto 100 mm culture dishes at  $5 \times 10^6$  cells/dish, and after a 24 hr culture, the cells were washed once with MEM medium without serum. Then, the cells were infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) expressing T7 RNA polymerase at room temperature for 1 hour (moi=2) (moi=2 to 3, preferably moi=2 is used). The virus used herein, was pretreated with 0.3 to 3 µg/ml psoralen and long-wave ultraviolet light (365 nm) for 2 to 20 min. Plasmids pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) were suspended in Opti-MEM medium (GIBCO) at ratio of 12 µg, 4 µg, 2 µg, and 4 µg/dish, respectively. Then, SuperFect transfection reagent (1 µg DNA/5 µl, QIAGEN) was added and left to stand at room temperature for 15 min and 3 ml Opti-MEM medium containing 3% FBS was added. Thereafter, the cells were washed twice with MEM medium without serum, and then DNA-SuperFect mixture was added. After a 3 hr culture, cells were washed twice with MEM medium without serum, and cultured 48 hours in MEM medium containing 40 µg/ml cytosine β-D-arabinofuranoside (AraC, Sigma).

Approximately 1/20 of field of view in 100 mm culture dish was observed by a fluorescence microscope and GFP-expressing cells were counted. To test the inactivation of vaccinia virus (vTF7-3), titer measurement by plaque formation (Yoshiyuki Nagai et al., virus experiment protocols, p291-296, 1995) was carried out.

Further, fixing the timing of recovery after transfection to day 3, psoralen and UV irradiation time were examined. Using vaccinia virus (vTF7-3) treated with each PLWUV treatment, reconstitution efficiency of Sendai virus was examined. Reconstitution was carried out by modifying the method of Kato et al., namely by the procedure described below. LLC-MK2 cells were seeded onto a 6-well microplate at  $5 \times 10^5$  cells/well, and after an overnight culture (cells were considered to grow to  $1 \times 10^6$  cells/well), PBS washed cells were infected with diluted vaccinia virus (vTF7-3) at  $2 \times 10^6$  pfu/100  $\mu$ l calibrated by titer before PLWUV treatment. After a 1 hour infection, 50  $\mu$ l of Opti-MEM medium (GIBCO) was added with 1, 0.5, 1, and 4  $\mu$ g of plasmid pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and additional type SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup>b (+)) (Hasan, M. K. et al., J. General Virology 78: 2813-2820, 1997), respectively. 10  $\mu$ l SuperFect (QIAGEN) was further added and left to stand at room temperature for 15 min. Then, 1 ml of Opti-MEM (containing 40  $\mu$ g/ml AraC) was added and overlaid onto the cells. Cells were recovered 3 days after transfection, then centrifuged and suspended in 100  $\mu$ l/well PBS. The suspension was diluted 10, 100, and 1000-fold and 100  $\mu$ l of resultant cell solution was inoculated into embryonated chicken eggs 10 days after fertilization, using 3 eggs for each dilution ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^3$  cells, respectively). After 3 days, allantoic fluid was recovered from the eggs and virus reconstitution was examined by HA test. To calculate reconstitution efficiency, eggs showing HA activity that were inoculated with  $1 \times 10^5$  cells,  $1 \times 10^4$  cells and  $1 \times 10^3$  cells, were counted as 1, 10, and 100 point(s), respectively.

#### <Results>

Results of Examples 12 and 13 are shown in Figures 40 to 43, and Table 2. The combination of envelope expressing plasmid and cell overlay increased the reconstitution efficiency of SeV/ $\Delta$ F-GFP. Notable improvement was obtained in d3 to d4 (day 3 to day4) of P0

(before subculture) (Figure 41). In Table 2, eggs were inoculated with cells 3 days after transfection. The highest reconstitution efficiency was obtained in day 3 when treated with 0.3  $\mu\text{g/ml}$  psoralen for 20 min. Thus, these conditions were taken as optimal conditions (Table 2).

Table 2: Effect of PLWUV treatment of vaccinia virus on reconstitution of Sendai virus

Effect of PLWUV treatment of vaccinia virus on reconstitution of Sendai virus (eggs were inoculated with cells 3 days after transfection)		The number of HA-positive eggs (b)									
		0 $\mu\text{g/ml}$		0.3 $\mu\text{g/ml}$		1 $\mu\text{g/ml}$		3 $\mu\text{g/ml}$			
		0'	20'	20'	20'	5'	10'	20'	2'	5'	10'
The number of inoculated cells	Score (a)										
$10^5$	1(a1)	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$10^4$	10(a2)	0	3	3	3	2	3	3	1	3	1
$10^3$	100(a3)	0	3	3	3	0	1	1	0	1	0
Reconstitution Score	$(a1+a2+a3) \times b$	0	333	43	133	133	133	133	13	133	13

$$\text{Reconstitution Score} = (a1+a2+a3) \times b$$

[Example 14] Preparation of LacZ-comprising, F-deficient, GFP-non-comprising Sendai virus vector

<Construction of F-deficient type, LacZ gene-comprising SeV vector cDNA>

To construct cDNA comprising LacZ gene at Not I restriction site existing at the upstream region of NP gene of pSeV18<sup>+</sup>/ΔF described in Example 1 (pSeV (+18:LacZ)/ΔF), PCR was performed to amplify the LacZ gene. PCR was carried out by adjusting LacZ gene to multiples of 6 (Hausmann, S et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)) and using primer (5'-GCGCGGCCGCGGTACGGTGGCAACCATGTCGTTTACTTTGACCAA-3'/SEQ ID NO: 17) comprising Not I restriction site for 5' end, and primer (5'-GCGCGGCCGCGCATGAACCTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGCTATTACTTC TGACACCAGACCAACTGGTA-3'/SEQ ID NO: 18) comprising transcription termination signal of SeV (E), intervening sequence (I), transcription initiation signal (S), and Not I restriction site for 3' end, using pCMV-β (Clontech) as template. The reaction conditions were as follows. 50 ng pCMV-β, 200 μM dNTP (Pharmacia Biotech), 100 pM primers, 4 U Vent polymerase (New England Biolab) were mixed with the accompanying buffer, and 25 reaction temperature cycles of 94°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 2 min were used. Resultant products were electrophoresed with agarose gel electrophoreses. Then, 3.2 kb fragment was cut out and digested with NotI after purification. pSeV(+18:LacZ)/ΔF was obtained by ligating with NotI digested fragment of pSeV18<sup>+</sup>/ΔF.

<Conventional method>

LLC-MK2 cells were seeded onto 100 mm culture dish at 5x 10<sup>6</sup> cells/dish, and after a 24 hour culture, the cells were washed once with MEM medium without serum. Then, the cells were infected with recombinant vaccinia virus (vTF7-3) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) expressing T7 RNA polymerase at room temperature for 1 hour (moi=2) (moi=2 to 3, preferably moi=2 is used). The virus used herein was pretreated with 3 μg/ml psoralen and long-wave ultraviolet light (365 nm) for 5 min. LacZ comprising, F-deficient type Sendai virus vector cDNA (pSeV(+18:LacZ) ΔF), pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) were suspended in Opti-MEM medium (GIBCO) at a ratio of 12 μg, 4 μg, 2 μg, and 4 μg/dish, respectively, 4 μg/dish envelope plasmid pGEM/FHN and SuperFect transfection reagent (1 μg DNA/5 μl, QIAGEN) were added and left to stand at room temperature for 15 min. Then, 3 ml Opti-MEM medium containing 3% FBS was added and the cells were

washed twice with MEM medium without serum, and then the DNA-SuperFect mixture was added. After a 3 hr culture, cells were washed twice with MEM medium without serum, and cultured 24 hours in MEM medium containing 40  $\mu\text{g/ml}$  cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin. Culture supernatants were removed and 5 ml of suspension of a 100 mm culture dish of F expressing LLC-MK2/F7 cells in MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g/ml}$  AraC and 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin) was overlaid onto the cells. After further a 48 hr culture, the cells and supernatants were recovered and designated as P0-d3 samples. The P0-d3 pellets were suspended in Opti-MEM medium ( $2 \times 10^7$  cells/ml) and after 3 times of freeze-thawing, were mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer Mannheim) ( $10^6$  cells/25  $\mu\text{l}$  DOSPER) and left to stand at room temperature for 15 min. Then, F expressing LLC-MK2/F7 cells were transfected with the mixture ( $10^6$  cells/well, 24-well plate) and cultured with MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g/ml}$  AraC and 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin). The culture supernatants were recovered on day 7, and designated as P1-d7 samples. Further, total volumes of supernatants were infected to F expressing LLC-MK2/F7 cells seeded onto 12-well plates at 37°C for 1 hour. Then, after washing once with MEM medium, the cells were cultured in MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g/ml}$  AraC and 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin). The culture supernatants were recovered on day 7, and were designated as P2-d7 samples. Further, total volumes of supernatants were infected to F expressing LLC-MK2/F7 cells seeded onto 6-well plates at 37°C for 1 hour. Then, after washing once with MEM medium, the cells were cultured in MEM medium without serum (containing 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin). The culture supernatants were recovered on day 7, and were designated as P3-d7 samples. Further, total volumes of supernatants were infected to F expressing LLC-MK2/F7 cells seeded onto 10 cm plates at 37°C for 1 hour. Then, after washing once with MEM medium, the cells were cultured in MEM medium without serum (containing 40  $\mu\text{g/ml}$  AraC and 7.5  $\mu\text{g/ml}$  trypsin). The culture supernatants were recovered on day 7, and were designated as P4-d7 samples.

<Measurement of CIU by counting LacZ-expressing cells (LacZ-CIU)>  
 LLC-MK2 cells were seeded onto 6-well plate at  $2.5 \times 10^6$  cells/well, and after a 24 hr culture, the cells were washed once

with MEM medium without serum and infected with 1/10 fold serial dilution series of P3-d7 made using MEM medium at 37°C for 1 hour. Then, the cells were washed once with MEM medium and 1.5 ml MEM medium containing 10% serum was added. After a three day culture at 37°C, cells were stained with  $\beta$ -Gal staining kit (Invitrogen). Result of experiment repeated three times is shown in Figure 44. As the result of counting LacZ staining positive cell number,  $1 \times 10^6$  CIU/ml virus was obtained in P3-d7 samples in any case.

10 [Example 15] Regulation of gene expression levels using polarity effect in Sendai virus

<Construction of SeV genomic cDNA>

Additional NotI sites were introduced into Sendai virus (SeV) full length genomic cDNA, namely pSeV(+) (Kato, A. et al., Genes to Cells 1: 569-579, 1996), in between start signal and ATG translation initiation signal of respective genes. Specifically, fragments of pSeV(+) digested with SphI/SalI (2645 bp), ClaI (3246 bp), and ClaI/EcoRI (5146 bp) were separated with agarose gel electrophoreses and corresponding bands were cut out and then recovered and purified with QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN) as shown in Figure 45 (A). The SphI/SalI digested fragment, ClaI digested fragment, and ClaI/EcoRI digested fragment were ligated to LITMUS38 (NEW ENGLAND BIOLABS), pBluescriptII KS+ (STRATAGENE), and pBluescriptII KS+ (STRATAGENE), respectively, for subcloning. Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) was used for successive introduction of NotI sites. Primers synthesized and used for each introduction were, sense strand: 5'-ccaccgaccacacccagcgccgacagccacggcttcgg-3' (SEQ ID NO: 19), antisense strand: 5'-ccgaagccgtggctgtcgcgccgctgggtgtgggtcggtgg-3' (SEQ ID NO: 20) for NP-P, sense strand: 5'-gaaatttcacctaagcgccgcaatggcagatatctatag-3' (SEQ ID NO: 21), antisense strand: 5'-ctatagatatctgccattgcgccgcttaggtgaaatttc-3' (SEQ ID NO: 22) for P-M, sense strand: 5'-gggataaagtcccttgcgccgcttggttgcaaaaactctcccc-3' (SEQ ID NO: 23), antisense strand: 5'-ggggagagagttttgcaaccaagcgccgcaagggactttatccc-3' (SEQ ID NO: 24)

for M-F, sense strand:  
 5'-ggtcgcgcggtacttttagcggccgcctcaaacaagcacagatcatgg-3' (SEQ ID NO:  
 25), antisense strand:  
 5'-ccatgatctgtgcttggttgaggcggccgctaaagtaccgcgcgacc-3' (SEQ ID NO:  
 5 26) for F-HN, sense strand:  
 5'-cctgcccattccatgacctagcggccgcttccattcaccctggg-3' (SEQ ID NO: 27),  
 antisense strand:  
 5'-cccagggtgaatgggaagcggccgctaggtcatggatgggcagg-3' (SEQ ID NO: 28)  
 for HN-L.

10 As templates, SalI/SphI fragment for NP-P, ClaI fragments for  
 P-M and M-F, and ClaI/EcoRI fragments for F-HN and HN-L, which were  
 subcloned as described above were used, and introduction was carried  
 out according to the protocol accompanying Quickchange Site-Directed  
 Mutagenesis kit. Resultants were digested again with the same enzyme  
 15 used for subcloning, recovered, and purified. Then, they were  
 assembled to Sendai virus genomic cDNA. As a result, 5 kinds of  
 genomic cDNA of Sendai virus (pSeV(+)NPP, pSeV(+)PM, pSeV(+)MF,  
 pSeV(+)FHN, and pSeV(+)HNL) in which NotI sites are introduced between  
 each gene were constructed as shown in Figure 45(B).

20 As a reporter gene to test gene expression level, human secreted  
 type alkaline phosphatase (SEAP) was subcloned by PCR. As primers,  
 5' primer: 5'-gcgggcgcgccatgctgctgctgctgctgctgctgggcctg-3' (SEQ ID  
 NO: 29) and 3' primer:  
 5'-gcgggcgcgcccttatcatgtctgctcgaagcggccggccg-3' (SEQ ID NO: 30)  
 25 added with AscI restriction sites were synthesized and PCR was  
 performed. pSEAP-Basic (CLONTECH) was used as template and Pfu turbo  
 DNA polymerase (STRATAGENE) was used as enzyme. After PCR, resultant  
 products were digested with AscI, then recovered and purified by  
 electrophoreses. As plasmid for subcloning, pBluescriptII KS+  
 30 incorporated in its NotI site with synthesized double strand DNA  
 [sense strand:  
 5'-gcgggcgcgctttaaacggcgcgccatttaaatccgtagtaagaaaaacttaggggtgaaagt  
 tcatcgcgccgc-3' (SEQ ID NO: 31), antisense strand:  
 5'-gcgggcgcgatgaactttcaccctaagtttttcttactacggatttaaatggcgcgccggtt  
 35 taaacggcgccgc-3' (SEQ ID NO: 32)] comprising multicloning site  
 (PmeI-AscI-SwaI) and termination signal-intervening

sequence-initiation signal was constructed (Figure 46). To AscI site of the plasmid, recovered and purified RCR product was ligated and cloned. The resultant was digested with NotI and the SEAP gene fragment was recovered and purified by electrophoreses to ligate into 5 types of Sendai virus genomic cDNA and NotI site of pSeV18+ respectively. The resultant virus vectors were designated as pSeV(+)NPP/SEAP, pSeV(+)PM/SEAP, pSeV(+)MF/SEAP, pSeV(+)FHN/SEAP, pSeV(+)HNL/SEAP, and pSeV18(+)/SEAP, respectively.

#### <Virus reconstitution>

LLC-MK2 cells were seeded onto 100 mm culture dishes at  $2 \times 10^6$  cells/dish, and after 24 hour culture the cells were infected with recombinant vaccinia virus (PLWUV-VacT7) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) expressing T7 polymerase for 1 hour (moi=2) at room temperature for 1 hour, in which the virus was pretreated with psoralen and UV. Each Sendai virus cDNA incorporated with SEAP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L were suspended in Opti-MEM medium (GIBCO) at ratio of 12  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, and 4  $\mu$ g/dish, respectively, 110  $\mu$ l of SuperFect transfection reagent (QIAGEN) was added, and left to stand at room temperature for 15 min and 3 ml Opti-MEM medium containing 3% FBS was added. Then, the cells were washed and DNA-SuperFect mixture was added. After a 3 to 5 hour culture, cells were washed twice with MEM medium without serum, and cultured 72 hours in MEM medium containing cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside (AraC). These cells were recovered and the pellets were suspended with 1 ml PBS, freeze-thawed three times. The 100  $\mu$ l of resultant was inoculated into chicken eggs, which was preincubated 10 days, and further incubated 3 days at 35°C, then, allantoic fluid was recovered. The recovered allantoic fluids were diluted to  $10^{-5}$  to  $10^{-7}$  and re-inoculated to chicken eggs to make it vaccinia virus-free, then recovered similarly and stocked in aliquots at -80°C. The virus vectors were designated as SeVNPP/SEAP, SeVPM/SEAP, SeVMF/SEAP, SeVFHN/SEAP, SeVHNL/SEAP, and SeV18/SEAP.

#### <Titer measurement by plaque assay>

CV-1 cells were seeded onto 6-well plates at  $5 \times 10^5$  cells/well and cultured for 24 hours. After washing with PBS, cells were incubated 1 hour with recombinant SeV diluted as  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$

and  $10^{-7}$  by BSA/PBS (1% BSA in PBS), washed again with PBS, then overlaid with 3 ml/well of BSA/MEM/agarose (0.2% BSA + 2x MEM, mixed with equivalent volume of 2% agarose) and cultured at 37°C, 0.5% CO<sub>2</sub> for 6 days. After the culture, 3 ml of ethanol/acetic acid (ethanol:acetic acid=1:5) was added and left to stand for 3 hours, then removed with agarose. After washing three times with PBS, cells were incubated with rabbit anti-Sendai virus antibody diluted 100-folds at room temperature for 1 hour. Then, after washing three times with PBS, cells were incubated with Alexa Flour™ labeled goat anti rabbit Ig(G+H) (Molecular Probe) diluted 200-folds at room temperature for 1 hour. After washing three times with PBS, fluorescence images were obtained by lumino-image analyzer LAS1000 (Fuji Film) and plaques were measured. Results are shown in Figure 47. In addition, results of titers obtained are shown in Table 3.

Table 3: Results of titers of each recombinant Sendai virus measured from results of plaque assay

Recombinant virus	Titer (pfu/ml)
SeV18/SEAP	$3.9 \times 10^9$
SeVNPP/SEAP	$4.7 \times 10^8$
SeVPM/SEAP	$3.8 \times 10^9$
SeVMF/SEAP	$1.5 \times 10^{10}$
SeVFHN/SEAP	$7.0 \times 10^9$
SeVHNL/SEAP	$7.1 \times 10^9$

#### <Comparison of reporter gene expression>

LLC-MK2 cells were seeded onto a 6-well plate at 1 to  $5 \times 10^5$  cells/well and after a 24 hour culture, each virus vector was infected at moi=2. After 24 hours, 100 µl of culture supernatants was recovered and SEAP assay was carried out. Assay was accomplished with Reporter Assay Kit -SEAP- (Toyobo) and measured by lumino-image analyzer LAS1000 (Fuji Film). The measured values were indicated as relative

values by designating value of SeV18+/SEAP as 100. As a result, SEAP activity was detected regardless of the position SEAP gene was inserted, indicated in Figure 48. SEAP activity was found to decrease towards the downstream of the genome, namely the expression level decreased. In addition, when SEAP gene is inserted in between NP and P genes, an intermediate expression level was detected, in comparison to when SEAP gene is inserted in the upstream of NP gene and when SEAP gene is inserted between P and M genes.

10 [Example 16] Increase of propagation efficiency of deficient SeV by double deficient  $\Delta$ F-HN overlay method

Since the SeV virus reconstitution method used now utilizes a recombinant vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase (vTF7-3), a portion of the infected cells is killed by the cytotoxicity of the vaccinia virus. In addition, virus propagation is possible only in a portion of cells and it is preferable if virus propagation could be done efficiently and persistently in a more cells. However, in the case of paramyxovirus, cell fusion occurs when F and HN protein of the same kind virus exists on the cells surface at the same time, causing syncytium formation (Lamb and Kolakofsky, 1996, Fields virology, p1189). Therefore, FHN co-expressing cells were difficult to subculture. Therefore, the inventors thought that recovery efficiency of deficient virus may increase by overlaying helper cells expressing deleted protein (F and HN) to the reconstituted cells. By examining overlaying cells with different times of FHN expression, virus recovery efficiency of FHN co-deficient virus was notably increased.

LLC-MK2 cells ( $1 \times 10^7$  cells/dish) grown to 100% confluency in 10 cm culture dishes was infected with PLWUV-treated vaccinia virus at moi=2 for 1 hour at room temperature. After that, mixing 12  $\mu$ g/10 cm dish, 4  $\mu$ g/10 cm dish, 2  $\mu$ g/10 cm dish, 4  $\mu$ g/10 cm dish, and 4  $\mu$ g/10 cm dish of FHN-deficient cDNA comprising d2EGFP (pSeV18+/ $\Delta$ FHN-d2GFP (Example 8)), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, and pGEM/FHN, respectively (3 ml/10cm dish as final volume), and using gene introduction reagent SuperFect (QIAGEN), LLC-MK2 cells were introduced with genes using a method similar to that as described above for the reconstitution

of F-deficient virus. After 3 hours, cells were washed three times with medium without serum, then, the detached cells were recovered by slow-speed centrifugation (1000 rpm/2 min) and suspended in serum free MEM medium containing 40 µg/ml AraC (Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO) and added to cells and cultured overnight. FHN co-expressing cells separately prepared, which were 100% confluent 10 cm culture dishes, were induced with adenovirus AxCANCre at MOI=10, and cells at 4 hours, 6 hours, 8 hours, day 2, and day 3 were washed once with 5 ml PBS(-) and detached by cell dissociation solution (Sigma). Cells were collected by slow speed centrifugation (1000 rpm/2 min) and suspended in serum free MEM medium containing 40 µg/ml AraC (Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO). This was then added to cells in which FHN co-deficient virus was reconstituted (P0) and cultured overnight. Two days after overlaying the cells, cells were observed using fluorescence microscopy to confirm the spread of virus by GFP expression within the cells. The results are shown in Figure 49. When compared to the conventional case (left panel) without overlaying with cells, notably more GFP-expressing cells were observed when cells were overlaid with cells (right). These cells were recovered, suspended with  $10^7$  cells/ml of Opti-MEM medium (GIBCO) and freeze-thawed for three times to prepare a cell lysate. Then, FHN co-expressing cells 2 days after induction were infected with the lysate at  $10^6$  cells/100 µl/well, and cultured 2 days in serum free MEM medium containing 40 µg/ml AraC (Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, and the virus titer of culture supernatant of P1 cells were measured by CIU-GFP (Table 4). As a result, no virus amplification effect was detected 4 hours after FHN induction, and notable amplification effects were detected 6 hours or more after induction due to cell overlaying. Especially, viruses released into P1 cell culture supernatant were 10 times more after 6 hours when cell overlaying was done compared to when cell overlaying was not done.

Table 4: Amplification of deficient SeV by double deficient  $\Delta F$ -HN cell overlay method

GFP -CIU		x10 <sup>3</sup> /ml				
		FHNcell+ad/cre				
FHN cell-		4h	6h	8h	2d	3d
8-10		6-9	80-100	70-100	60-100	20-50

[Example 17] Confirmation of pseudotype Sendai virus's possession of F-deficient genome

Western analysis of proteins of extracts of infected cells was carried out to confirm that the virus propagated by VSV-G gene expression described above is F-deficient type. As a result, proteins derived from Sendai virus were detected, whereas F protein was not detected, confirming that the virus is F-deficient type (Figure 50).

[Example 18] Effect of anti-VSV antibody on infectiousness of pseudotype Sendai virus comprising F and HN gene-deficient genome

To find out whether pseudotype Sendai virus comprising F and HN gene-deficient genome, which was obtained by using VSV-G expressing line, comprises VSV-G protein in its capsid, neutralizing activity of whether or not infectiousness is affected was examined using anti-VSV antibody. Virus solution and antibody were mixed and left to stand for 30 min at room temperature. Then, LLCG-L1 cells in which VSV-G expression has not been induced were infected with the mixture and gene-introducing capability on day 4 was analyzed by the existence of GFP-expressing cells. As a result, perfect inhibition of infectiousness was seen by anti-VSV antibody in the pseudotype Sendai virus comprising F and HN gene-deficient genome (VSV-G in the Figure), whereas no inhibition was detected in Sendai virus comprising proper capsid (F, HN in the Figure) (Figure 51). Thus, the virus obtained in the present example was proven to be pseudotype Sendai virus comprising VSV-G protein as its capsid, and that its infectiousness can be specifically inhibited by the antibody.

[Example 19] Purification of pseudotype Sendai viruses comprising F gene-deficient and F and HN gene-deficient genomes by density gradient ultracentrifugation

Using culture supernatant of virus infected cells, sucrose density gradient centrifugation was carried out, to fractionate and purify pseudotype Sendai virus comprising deficient genomes of F gene and F and HN genes. Virus solution was added onto a sucrose solution with a 20 to 60% gradient, then ultracentrifuged for 15 to 16 hours at 29000 rpm using SW41 rotor (Beckman). After ultracentrifugation, a hole was made at the bottom of the tube, then 300  $\mu$ l fractions were collected using a fraction collector. For each fraction, Western analysis were carried out to test that the virus is a pseudotype Sendai virus comprising a genome deficient in F gene or F and HN genes, and VSV-G protein as capsid. Western analysis was accomplished by the method as described above. As a result, in F-deficient pseudotype Sendai virus, proteins derived from the Sendai virus, HN protein, and VSV-G protein were detected in the same fraction, whereas F protein was not detected, confirming that it is a F-deficient pseudotype Sendai virus. On the other hand, in F and HN-deficient pseudotype Sendai virus, proteins derived from Sendai virus, and VSV-G protein were detected in the same fraction, whereas F and HN protein was not detected, confirming that it is F and HN deficient pseudotype Sendai virus (Figure 52).

[Example 20] Overcoming of haemagglutination by pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient and F and HN gene-deficient genomes

LLC-MK2 cells were infected with either pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient or F and HN gene-deficient genome, or Sendai virus with normal capsid, and on day 3, 1% avian red blood cell suspension was added, and left to stand for 30 min at 4°C. Thereafter, cell surface of infected cells expressing GFP were observed. As a result, for virus with F gene-deficient genome and F-deficient pseudotype Sendai virus (SeV/ $\Delta$ F, and pseudotype SeV/ $\Delta$ F(VSV-G) by VSV-G), agglutination reaction was observed on the surface of infected cells, as well as for the Sendai virus with the original capsid. On the other hand, no agglutination reaction was

observed on the surface of infected cells for pseudotype Sendai virus comprising F and HN gene-deficient genome (SeV/ $\Delta$ F-HN(VSV-G)) (Figure 53).

5 [Example 21] Infection specificity of VSV-G pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient genome to cultured cells

Infection efficiency of VSV-G pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient genome to cultured cells was measured by the degree of GFP expression in surviving cells 3 days after  
10 infection using flow cytometry. LLC-MK2 cells showing almost the same infection efficiency in pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient genome and Sendai virus with original capsid were used as controls for comparison. As a result, no difference in infection efficiency was found in human ovary cancer HRA cells, whereas in Jurkat  
15 cells of T cell lineage about 2-fold increase in infection efficiency of VSV-G pseudotype Sendai virus comprising F gene-deficient genome was observed compared to controls (Figure 54).

20 [Example 22] Construction of F-deficient type Sendai virus vector comprising NGF

<Reconstitution of NGF/SeV/ $\Delta$ F>

Reconstitution of NGF/SeV/ $\Delta$ F was accomplished according to the above described "Envelope plasmid + F expressing cells overlaying method". Measurement of titer was accomplished by a method using  
25 anti-SeV polyclonal antibody.

<Confirmation of virus genome of NGF/SeV/ $\Delta$ F (RT-PCR)>

To confirm NGF/SeV/ $\Delta$ F virus genome (Figure 55, upper panel), culture supernatant recovered from LLC-MK2/F7 cells were centrifuged, and RNA was extracted using QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) according  
30 to the manufacturer's protocol. Using the RNA template, synthesis and PCR of RT-PCR was carried out using SUPERScript™ ONE-STEP™ RT-PCR SYSTEM (GIBCO BRL). As control groups, additional type SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup>b(+)) (Hasan, M. K. et al., J. General Virology 78: 2813-2820, 1997) was used. NGF-N and NGF-C were used as PCR primers. For NGF-N,  
35 forward: ACTTGCGGCCGCCAAAGTTCAGTAATGTCCATGTTGTTCTACTCTG (SEQ ID NO: 33), and for NGF-C, reverse:

ATCCGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGTCAGCCTCTTCTTGTAGC  
CTTCCTGC (SEQ ID NO: 34) were used. As a result, when NGF-N and NGF-C  
were used as primers, an NGF specific band was detected for NGF/SeV/ $\Delta$ F  
in the RT conditions. No band was detected for the control group  
(Figure 55, bottom panel).

[Example 23] NGF protein quantification and measurement of *in vitro*  
activity expressed after infection of F-deficient type SeV comprising  
NGF gene

Infection and NGF protein expression was accomplished using  
LLC-MK2/F or LLC-MK2 cells grown until almost confluent on culture  
plates of diameter of 10 cm or 6 cm. NGF/SeV/ $\Delta$ F and NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP  
were infected to LLC-MK2/F cells, and NGF/SeV and GFP/SeV were  
infected to LLC-MK2 cells at m.o.i 0.01, and cultured 3 days with  
MEM medium without serum, containing 7.5  $\mu$ g/ml trypsin (GIBCO).  
After the 3 day culture, in which almost 100% of cells are infected,  
medium was changed to MEM medium without trypsin and serum and further  
cultured for 3 days. Then, each culture supernatant were recovered  
and centrifuged at 48,000x g for 60 min. Then, quantification of NGF  
protein and measurement of *in vitro* activity for the supernatant were  
carried out. Although in the present examples, F-deficient type SeV  
(NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP) (see Figure 55) are infected to  
LLC-MK2/F cells, if infected with a high m.o.i. (e.g. 1 or 3), namely,  
infected to cells that are nearly 100% confluent from the beginning,  
experiment giving similar results can be performed using F  
non-expressing cells.

For NGF protein quantification, ELISA kit NGF Emax Immuno Assay  
System (Promega) and the accompanying protocol were used. 32.4  $\mu$ g/ml,  
37.4  $\mu$ g/ml, and 10.5  $\mu$ g/ml of NGF protein were detected in NGF/SeV/ $\Delta$ F,  
NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP, and NGF/SeV infected cell culture supernatant,  
respectively. In the culture supernatant of NGF/SeV/ $\Delta$ F and  
NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP infected cells, high concentration of NGF protein  
exists, similar to culture supernatant of NGF/SeV infected cells,  
confirming that F-deficient type SeV expresses enough NGF.

The measurement of *in vitro* activity of NGF protein was  
accomplished by using a dissociated culture of primary chicken dorsal

root ganglion (DRG; a sensory neuron of chicken) using survival activity as an index (Nerve Growth Factors (Wiley, New York), pp.95-109 (1989)). Dorsal root ganglion was removed from day 10 chicken embryo, and dispersed after 0.25% trypsin (GIBCO) treatment at 37°C for 20 min. Using high-glucose D-MEM medium containing 100 units/ml penicillin (GIBCO), 100 units/ml streptomycin (GIBCO), 250 ng/ml amphotericin B (GIBCO) 20  $\mu$ M 2-deoxyuridine (Nakarai), 20  $\mu$ M 5-fluorodeoxyuridine (Nakarai), 2 mM L-glutamine (Sigma), and 5% serum, cells were seeded onto 96-well plate at about 5000 cells/well. Polylysine precoated 96-well plates (Iwaki) were further coated with laminin (Sigma) before use. At the start point, control NGF protein or previously prepared culture supernatant after SeV infection was added. After 3 days, cells were observed under a microscope as well as conducting quantification of surviving cells by adding Alamar blue (CosmoBio) and using the reduction activity by mitochondria as an index (measuring 590 nm fluorescence, with 530 nm excitation). Equivalent fluorescence signals were obtained in control (without NGF addition) and where 1/1000 diluted culture supernatant of cells infected with SeV/additional-type-GFP (GFP/SeV) was added, whereas the addition of 1/1000 diluted culture supernatant of cells infected with NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP, and NGF/SeV caused a notable increase in fluorescence intensity, and was judged as comprising a high number of surviving cells and survival activity (Figure 56). The value of effect was comparable to the addition of amount of NGF protein calculated from ELISA. Observation under a microscope proved a similar effect. Namely, by adding culture supernatant of cells infected with NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP, and NGF/SeV, increase in surviving cells and notable neurite elongation was observed (Figure 57). Thus, it was confirmed that NGF expressed after infection of NGF-comprising F-deficient type SeV is active form.

#### [Example 24] Detailed analysis of F-expressing cells

##### 1. moi and induction time course of Adeno-Cre

By using different moi of Adeno-Cre, LLC-MK2/F cells were infected and after induction of F protein, the amount of protein expression and the change in cell shape were analyzed.

Expression level was slightly higher in moi=10 compared with moi=1 (Figure 58). When expression amounts were analyzed at time points of 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h after induction, high expression level of F protein at 48 h after induction was detected in all cases.

In addition, changes in cell shape were monitored in a time course as cells were infected with moi=1, 3, 10, 30, and 100. Although a notable difference was found up to moi=10, cytotoxicity was observed for moi=30 or over (Figure 59).

## 2. Passage number

After induction of F protein to LLC-MK2/F cells using Adeno-Cre, cells were passaged 7 times and expression level of F protein and the morphology of the cells were analyzed using microscopic observation. On the other hand, laser microscopy was used for analysis of intracellular localization of F protein after induction of F protein in cells passaged until the 20<sup>th</sup> generation.

For laser microscopic observation, LLC-MK2/F cells induced with F protein expression were put into the chamber glass and after overnight culture, media were removed and washed once with PBS, then fixed with 3.7% Formalin-PBS for 5 min. Then after washing cells once with PBS, cells were treated with 0.1% Triton X100-PBS for 5 min, and treated with anti-F protein monoclonal antibody ( $\gamma$ -236) (1/100 dilution) and FITC labeled goat anti-rabbit IgG antibody (1/200 dilution) in this order, and finally washed with PBS and observed with a laser microscope.

As a result, no difference was found in F protein expression levels in cells passaged up to 7 times (Figure 60). No notable difference was observed in morphological change, infectiousness of SeV, and productivity. On the other hand, when cells passaged up to 20 times were analyzed for intracellular localization of F protein using the immuno-antibody method, no big difference was found up to 15 passages, but localization tendency of F protein was observed in cells passaged more than 15 times (Figure 61).

Taken together, cells before 15 passages are considered desirable for the production of F-deficient SeV.

[Example 25] Correlation between GFP-CIU and anti-SeV-CIU

Correlation of the results of measuring Cell-Infected Unit (CIU) by two methods was analyzed. LLC-MK2 cells were seeded onto a 12-well plate at  $2 \times 10^5$  cells/dish, and after a 24 hour culture, cells were washed once with MEM medium without serum, and infected with 100  $\mu$ l/well SeV/ $\Delta$ F-GFP. After 15 min, 1 ml/well serum-free MEM medium was added and further cultured for 24 hours. After the culture, cells were washed three times with PBS(-) and dried up (left to stand for approximately 10 to 15 min at room temperature) and 1 ml/well acetone was added to fix cells and was immediately removed. Cells were dried up again (left to stand for approximately 10 to 15 min at room temperature). Then, 300  $\mu$ l/well of anti-SeV polyclonal antibody (DN-1) prepared from rabbits and diluted 1/100 with PBS(-) was added to cells and incubated at 37°C for 45 min and washed three times with PBS(-). Then, to the cells, 300  $\mu$ l/well of anti-rabbit IgG(H+D) fluorescence-labeled second antibody (Alex<sup>TM</sup> 568, Molecular Probes) diluted 1/200 with PBS(-) was added, and incubated at 37°C for 45 min and washed three times with PBS(-). Then, cells with fluorescence were observed under fluorescence microscopy (Emission: 560 nm, Absorption: 645 nm, Filters: Leica).

As a control, cells were infected with 100  $\mu$ l/well of SeV/ $\Delta$ F-GFP and after 15 min, 1 ml/well of MEM without serum was added. After a further 24 hour culture, GFP-expressing cells were observed under fluorescence microscopy (Emission: 360 nm, Absorption: 470 nm, Filters: Leica) without further manipulations.

A Good correlation was obtained by evaluating the fluorescence intensity by quantification (Figure 62).

#### [Example 26] Construction of multicloning site

A multicloning site was added to the SeV vector. The two methods used are listed below.

1. Several restriction sites in full-length genomic cDNA of Sendai virus (SeV) and genomic cDNA of pSeV18<sup>+</sup> were disrupted, and another restriction site comprising the restriction site disrupted was introduced in between start signal and ATG translation initiation signal of each gene.

2. Into already constructed SeV vector cDNA, multicloning site

sequence and transcription initiation signal - intervening sequence-termination signal were added and incorporated into NotI site.

In the case of method 1, as an introducing method, EagI-digested fragment (2644 bp), ClaI-digested fragment (3246 bp),  
 5 ClaI/EcoRI-digested fragment (5146 bp), and EcoRI-digested fragment (5010 bp) of pSeV18<sup>+</sup> were separated by agarose electrophoreses and the corresponding bands were cut out, then it was recovered and purified by QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN). EagI-digested  
 10 fragment was ligated and subcloned into LITMUS38 (NEW ENGLAND BIOLABS) and ClaI-digested fragment, ClaI/EcoRI-digested fragment, and EcoRI-digested fragment were ligated and subcloned into pBluescriptII KS<sup>+</sup> (STRATAGENE). Quickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) was used for successive disruption and introduction of restriction sites.

15 For disruption of restriction sites, Sal I: (sense strand) 5'-ggagaagtctcaacaccgtccaccaagataatcgatcag-3' (SEQ ID NO: 35), (antisense strand) 5'-ctgatcgattatcttgggtggacggtgttgagacttctcc-3' (SEQ ID NO: 36), Nhe I: (sense strand) 5'-gtatatgtgttcagttgagcttgctgtcgggtctaaggc-3' (SEQ ID NO: 37),  
 20 (antisense strand) 5'-gccttagaccgacagcaagctcaactgaacacatatac-3' (SEQ ID NO: 38), Xho I: (sense strand) 5'-caatgaactctctagagaggctggagtcactaaagagttacctgg-3' (SEQ ID NO: 39), (antisense strand) 5'-ccaggtaactctttagtgactccagcctctctagagagttcattg-3' (SEQ ID NO: 40),  
 25 and for introducing restriction sites, NP-P: (sense strand) 5'-gtgaaagttcatccaccgatcggctcactcgaggccacaccaaccccaccg-3' (SEQ ID NO: 41), (antisense strand) 5'-cggtggggttgggtgtggcctcgagtgagccgatcgggtggatgaactttcac-3' (SEQ ID NO: 42), P-M: (sense strand) 5'-cttagggtgaaagaaatttcagctagcacggcgcaatggcagatatc-3' (SEQ ID NO: 43), (antisense strand) 5'-gatatctgccattgcgccgtgctagctgaaatttctttcaccctaag-3' (SEQ ID NO: 44), M-F: (sense strand) 5'-cttagggataaagtcccttgtgcgcgcttggttgcaaaactctcccc-3' (SEQ ID NO: 45), (antisense strand) 5'-ggggagagttttgcaaccaagcgcgcacaaagggactttatccctaag-3' (SEQ ID NO: 35)

46), F-HN: (sense strand)  
 5'-ggtcgcgcggtacttttagtcgacacctcaaacaagcacagatcatgg-3' (SEQ ID  
 NO:47), (antisense strand)  
 5'-ccatgatctgtgcttggttgaggtgtcgactaaagtaccgcgcgacc-3' (SEQ ID  
 5 NO:48), HN-L: (sense strand)  
 5'-cccagggatgaatgggaagggccggccaggtcatggatgggcaggagtcc-3' (SEQ ID  
 NO: 49), (antisense strand)  
 5'-ggactcctgcccattccatgacctggccggcccttccattcaccctggg-3' (SEQ ID  
 NO: 50), were synthesized and used for the reaction. After  
 10 introduction, each fragment was recovered and purified similarly as  
 described above, and cDNA were assembled.

In the case of method 2, (sense strand)  
 5'-ggccgcttaattaacggttttaacgcgcgccaacagtgttgataagaaaaacttaggggtga  
 aagttcatcac-3' (SEQ ID NO: 51), (antisense strand)  
 15 5'-ggccgtgatgaactttcaccctaagtttttcttatcaaacactgttggcgcgcggtttaaac  
 gttaattaagc-3' (SEQ ID NO: 52), were synthesized, and after  
 phosphorylation, annealed by 85°C 2 min, 65°C 15 min, 37°C 15 min,  
 and room temperature 15 min to incorporate into SeV cDNA.  
 Alternatively, multicloning sites of pUC18 or pBluescriptII, or the  
 20 like, are subcloned by PCR using primers comprising termination signal  
 - intervening sequence - initiation signal and then incorporate the  
 resultant into SeV cDNA. The virus reconstitution by resultant cDNA  
 can be performed as described above.

## 25 Industrial Applicability

The present invention provided Paramyxoviridae virus-derived  
 RNP deficient in at least one envelope gene, and the utilization  
 thereof as a vector. As a preferable embodiment, vectors comprising  
 a complex of RNP and a cationic compound are provided. By applying  
 30 present invention, antigenicity and/or cytotoxicity problems can be  
 avoided when introducing vectors into target cells.

**CLAIMS**

1. A complex comprising (a) a negative-strand single-stranded RNA derived from a paramyxovirus, wherein said RNA is modified so as not  
5 express at least one of the envelope proteins of Paramyxoviridae viruses, and (b) a protein encoded by and binding to said negative-strand single-stranded RNA.
2. A complex according to claim 1, wherein said negative-strand single-stranded RNA is modified so as to express NP, P and L proteins,  
10 but not F, HN or M proteins, or any combination thereof.
3. A complex according to claim 1 or 2, wherein said negative-strand single-stranded RNA derives from the Sendai virus.
4. A complex according to any of claims 1 through 3, wherein said negative-strand single-stranded RNA further encodes a foreign gene.
- 15 5. A composition for gene transfer, comprising a complex according to claim 4 and a cationic lipid.
6. A composition for gene transfer, comprising a complex according to claim 4 and a cationic polymer.
7. A method for expressing a foreign gene in a cell, comprising the  
20 step of introducing the composition for gene transfer according to claim 5 or 6 into a cell.

**ABSTRACT**

5 A functional RNP containing negative-strand single-stranded RNA derived from Sendai virus, which has been modified so as not to express any envelope protein, has been successfully prepared. An RNP comprising a foreign gene is prepared and inserted into a cell with the use of a cationic liposome, thereby successfully expressing the foreign gene.



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/45, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/70055</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月23日(23.11.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/03194</p> <p>(22) 国際出願日 2000年5月18日(18.05.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/200740 1999年5月18日(18.05.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 李 海鷗(LI, Hai-Ou)(CN/JP) 朱 亜峰(SHU, Tsugumine)(JP/JP) 上田泰次(UEDA, Yasuji)(JP/JP) 長谷川護(HASEGAWA, Mamoru)(JP/JP) 飯田章博(IIDA, Akihiro)(JP/JP) 平田隆洋(HIRATA, Takahiro)(JP/JP) 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki, (JP) 隈 秀和(KUMA, Hidekazu)(JP/JP) 〒301-0044 茨城県竜ヶ崎市の小柴4-6-3 久光製薬株式会社 竜ヶ崎ハイツA203 Ibaraki, (JP)</p>		<p>浅川 誠(ASAKAWA, Makoto)(JP/JP) 〒561-0825 大阪府豊中市二葉町3-2-1 シオノギ神崎川寮319号室 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特 許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシ ア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開さ れる。</p>
<p>(54)Title: RNP ORIGINATING IN PARAMYXOVIRUS</p> <p>(54)発明の名称 パラミクソウイルスに由来するRNP</p> <p>(57) Abstract A functional RNP containing (-)-chain single stranded RNA originating in Sendai virus which has been modified so as not to express any envelope protein. An RNP containing this foreign gene is prepared and inserted into a cell with the use of a cationic liposome, thereby successfully expressing the foreign gene.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

エンペローブタンパク質を発現しないように改変されたセンダイウイルス由来の（－）鎖一本鎖RNAを含む機能的なRNPを作製することに成功した。また、この外来遺伝子を含むRNPを製造し、カチオン性リボソームを利用して細胞に導入して外来遺伝子を発現させることに成功した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	US	米国
CI	コートジボワール	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国				
DK	デンマーク						

## 明細書

## パラミクソウイルスに由来するRNP

技術分野

本発明は、パラミクソウイルスに由来するリボ核酸タンパク質複合体およびその利用に関する。

背景技術

パラミクソウイルスは、マイナス鎖RNAをゲノムとして有するウイルスである。マイナス鎖RNAウイルスベクターは、レトロウイルス、DNAウイルス、またはプラス鎖RNAウイルスベクターとは大きく異なる幾つかの特徴を持っている。そのゲノムまたはアンチゲノムは直接にmRNAとしては機能せず、ウイルスのタンパク質合成やゲノム複製を開始させることはできない。ウイルスのRNAゲノムもアンチゲノムも常にリボ核酸タンパク質複合体 (ribonucleoprotein complex; RNP) の形で存在し、プラス鎖RNAウイルスのように、mRNAsが相補的な裸のゲノムRNAにハイブリダイズしてゲノムのRNPへのアセンブリを妨害するといったアンチセンスの問題が殆ど起きない。これらのウイルスは自身のRNAポリメラーゼを持って、RNP複合体を鋳型にしてウイルスmRNAの転写またはウイルスゲノムの複製を行う。特筆すべきことにマイナス鎖RNA (nsRNA) ウイルスは宿主細胞の細胞質でのみ増殖し、DNAフェーズを持たないため染色体への組み込み (integration) は起こらない。更にはRNA同士の相同組み換えも認められていない。これらの性質はマイナス鎖RNAウイルスの遺伝子発現ベクターとしての安定性と安全性に大きく寄与するものと思われる。

本発明者らはnsRNAウイルスの中でもセンドイウイルス (SeV) に注目してきた。センドイウイルスは非分節型マイナス鎖RNAウイルスで、パラミクソウイルス (

paramyxovirus) に属し、murine parainfluenza virusの一種である。このウイルスはヒトに対して病原性がないと言われている。また、ラボ弱毒株 (Z strain) も分離されており、自然宿主であるげっ歯類に対し軽度の肺炎を誘発する程度である (J. of General Virology (1997) 78, 3207-3215)。この株はパラミクソウイルスの転写複製機構等の分子レベルにおける研究モデルとして広く用いられてきた。センダイウイルスは二つのエンベロープ糖タンパク質であるhemagglutinin-neuraminidase(HN) とfusion protein(F) を介して宿主細胞膜に接着、膜融合を起こし、効率的に自分のRNAポリメラーゼとリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体の形で存在するRNAゲノムを細胞質に放出し、そこでウイルスのmRNAの転写及びゲノムの複製を行う (Bitzer, M. et al., J. Virol. 71(7):5481-5486, 1997)。

本発明者らはこれまでに、センダイウイルスゲノムに対応するcDNAから感染性センダイウイルス粒子を回収する方法を開発している。この方法においては、例えば、LLC-MK2細胞にT7 RNA ポリメラーゼをコードするワクシニアウイルスを感染させた後、T7プロモーターでコントロールするセンダイウイルスのアンチゲノムをコードするプラスミドと、センダイウイルスの核タンパク質(NP)、RNAポリメラーゼタンパク質(P および L)をコードしている3つのプラスミドと同時に細胞にトランスフェクションし、細胞内でウイルスのゲノム複製の中間体であるアンチゲノムのリボ核酸タンパク質複合体(RNPs)を形成させ、次いでウイルスタンパク質の転写、またウイルス粒子のアセンブリーを開始する生物学的に活性のある(機能的な) ゲノムRNPsに複製させる。野生型センダイウイルスの回収の場合には、この機能的なゲノムRNPsを再構成細胞もろとも鶏卵のChorioallantoic sacに注入してビリオンの増幅を行う (Kato, A. et al. Genes cells 1, 569-579 (1996))。

しかしながら、センダイウイルスは、ウイルス粒子形成の際に宿主のタンパク質を取り込むことが知られており (J.B.C. (1997) 272, 16578-16584)、このよう

なタンパク質は、標的細胞に導入した際に抗原性や細胞傷害性の原因となることが考えられた。

ここに、センダイウイルス粒子を利用しない、RNPのベクターとしての利用の必要性が存在していたが、いまだにそのような利用の報告例はない。

#### 発明の開示

本発明は、パラミクソ科ウイルスに由来するRNPを単離し、そのベクターとしての利用を提供することを課題とする。好ましい態様において、RNPとカチオン性化合物との複合体からなるベクターが提供される。

本発明者等は、パラミクソ科ウイルスであるセンダイウイルスからRNPを調製し、それがベクターとして使用しうるかの検討を行なった。

具体的には、まず、標的細胞内で野生型センダイウイルスを生産しないようにするために、該ウイルスのエンベロープタンパク質であるFタンパク質の遺伝子を欠損したセンダイウイルスゲノムcDNAを調製し、さらに細胞内で該cDNAを発現させるためのベクターを構築した(該ベクターにはF遺伝子欠損部位にレポーターとしてGFP遺伝子が挿入されている)。これにより調製したベクターをRNPの構成に必要なタンパク質を発現する細胞に導入し、該細胞内でF遺伝子欠損ゲノムを有するRNPを生成させた。次いで、該細胞に対し凍結融解処理を繰り返すことにより該細胞からRNPを取り出し、これをカチオン性のリポフェクション試薬と混合して、F遺伝子発現細胞に導入した。その結果、RNPが導入された細胞では、レポーターであるGFPの発現が検出された。

即ち、本発明者等は、センダイウイルスから機能的なRNPを調製することに成功すると共に、これをセンダイウイルス粒子の構成要素として細胞に感染させるのではなく、例えばカチオン性リポソームという遺伝子導入試薬を利用して細胞に導入した場合でも、RNPに含まれる外来遺伝子が発現させることが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、パラミクソウイルス由来のRNPおよびそのベクターとしての利用に関し、より詳しくは、

(1) (a) パラミクソ科ウイルスの少なくとも一つのエンベロープタンパク質を発現しないように改変された、パラミクソウイルスに由来する (一) 鎖一本鎖RNA、および (b) 該 (一) 鎖一本鎖RNAによりコードされる、該RNAに結合するタンパク質、からなる複合体、

(2) (一) 鎖一本鎖RNAがNPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質を発現し、Fタンパク質、HNタンパク質、若しくはMタンパク質またはこれらの組み合わせを発現しないように改変されている、(1) に記載の複合体、

(3) (一) 鎖一本鎖RNAがセンダイウイルスに由来する、(1) または (2) に記載の複合体、

(4) (一) 鎖一本鎖RNAが、さらに外来遺伝子をコードしている、(1) から (3) のいずれかに記載の複合体、

(5) (4) に記載の複合体およびカチオン性脂質を含む遺伝子導入用組成物、

(6) (4) に記載の複合体およびカチオン性ポリマーを含む遺伝子導入用組成物、

(7) (5) または (6) に記載の遺伝子導入用組成物を細胞に導入する工程を含む、該細胞内で外来遺伝子を発現させる方法、に関する。

パラミクソウイルス科ウイルスの「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。また、一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

レスピロウイルス属	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
-----------	---	-------	---	---	----	---	---

ルブラウイルス属	N	P/V	M	F	HN	(SH)	L
----------	---	-----	---	---	----	------	---

モービリウイルス属    N    P/C/V    M    F    H    -    L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

本発明は、エンベロープ遺伝子欠損型のパラミクソ科ウイルスに由来するリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体に関する。該複合体は、エンベロープタンパク質がなければ、標的細胞内でエンベロープタンパク質を有するウイルスを生産しないように改変されている。即ち、本発明のRNPは、(a) パラミクソ科ウイルスの少なくとも一つのエンベロープタンパク質を発現しないように改変されたパラミクソウイルスに由来する (一) 鎖一本鎖RNA、および (b) 該 (一) 鎖一本鎖RNAによりコードされる、該RNAに結合するタンパク質、からなる。

(一) 鎖一本鎖RNAと結合するタンパク質とは、該 (一) 鎖一本鎖RNAと直接および/または間接に結合し、該 (一) 鎖一本鎖RNAと複合体を形成するタンパク質のことを言う。一般に、パラミクソウイルスの (一) 鎖一本鎖RNA (ゲノムRNA) には、NPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質が結合している。このRNPに含まれるRNAが、RNAの転写および複製のための鋳型となる (Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. *In* Fields Virology, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). 本発明の複合体

には、パラミクソウイルスに由来する（－）鎖一本鎖RNAおよびそれに結合するパラミクソウイルスに由来するタンパク質からなる複合体が含まれる。本発明の複合体は、例えば（－）鎖一本鎖RNAにこれらのタンパク質（NP、P、およびLタンパク質）が結合したRNP複合体である。一般に、パラミクソウイルスのRNP複合体は、細胞内で自立的にRNP複合体を複製する能力を有する。このように、細胞に導入されたRNPは細胞内で増幅して遺伝子（RNP複合体に含まれるRNA）のコピー数を増やす。これにより、外来遺伝子を持つRNPからの外来遺伝子の高い発現がもたらされる。本発明のベクターは、好ましくは、細胞内で複合体（RNP）に含まれるRNAを複製する能力を有するものである。

本発明の複合体（RNP）の由来としては、パラミクソ科ウイルスであれば特に制限はないが、パラミクソウイルス属に属するウイルス、特にセンダイウイルスが好適である。本発明の複合体（RNP）の由来としては、センダイウイルス以外に、例えば、麻疹ウイルス、サルバラインフルエンザウイルス（SV5）、ヒトパラインフルエンザウイルス3型などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のRNPに含まれる（－）鎖一本鎖RNAは、パラミクソ科ウイルスの少なくとも一つのエンベロープタンパク質の発現が抑制されるように構築されている。発現を抑制するエンベロープタンパク質としては、Fタンパク質、HNタンパク質、若しくはMタンパク質が挙げられる。また、これらの組み合わせであってもよい。

（－）鎖一本鎖RNAは、RNPの形成に必要なNPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質を発現するように構築されている。本発明のRNPに含まれる（－）鎖一本鎖RNAは、例えば、NPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質を発現し、Fタンパク質および/またはHNタンパク質を発現しないように改変されているものであってよい。

センダイウイルス（Sendai virus; SeV）の場合、天然のウイルスのゲノムサイズは約15,000塩基で、ネガティブ鎖は 3' の短いリーダー領域に続き、NP（ヌcleoキャプシド）、P（ホスホ）、M（マトリックス）、F（フュージョン）、HN（ヘマグ

ルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL(ラージ)蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。本発明においては、このうちF、HN、およびM遺伝子のうちいずれか、あるいはそれらの組み合わせを欠損するゲノムを設計することにより、エンベロープタンパク質を発現しないように改変することができる。好ましくはF遺伝子またはHN遺伝子、あるいはF遺伝子とHN遺伝子の両方を欠損している。RNPの形成にはこれらの蛋白質は必要ないため、NP、P、およびLタンパク質の存在下でこのゲノムRNA(ポジティブ鎖またはネガティブ鎖)を転写させることにより、本発明のRNPを製造することができる。RNPの形成は、例えばLLC-MK2細胞などで行わせることができる。NP、P、およびLタンパク質の供給は、各遺伝子をコードする発現ベクターを細胞に導入することにより行われ得る(実施例参照)。また、各遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれていてもよい。RNPを形成させるために発現させるNP、P、およびL遺伝子は、RNP中に含まれるゲノムにコードされるNP、P、およびL遺伝子と完全に同一である必要はない。すなわち、これらの遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列は、RNPゲノムがコードするタンパク質のアミノ酸配列そのままでなくとも、ゲノムRNAと結合し、細胞内でRNPの複製を行う活性を持つ限り、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。一端RNPが形成されれば、このRNPからNP、P、およびL遺伝子が発現され、細胞内で自立的にRNPが複製する。

細胞内でRNPを再構成させ増幅させるためには、RNPに含まれる(一)鎖一本鎖RNAにおいて発現しないように改変されたエンベロープタンパク質を発現する細胞(ヘルパー細胞)にRNPを導入するか、またはこの細胞でRNPを再構成させることができる。例えば、F遺伝子が発現しないように改変された(一)鎖一本鎖RNAからRNPを増幅するには、細胞において、NP、P、およびLタンパク質と共にFタンパク質を発現させる。これにより、エンベロープタンパク質を保持するウイルスベクターが構築され、ヘルパー細胞への感染を介して増幅される。

また、(一)鎖一本鎖RNAにおいて発現しないように改変されたエンベロープタ

ンパク質とは異なるエンベローブタンパク質を用いることも可能である。このようなエンベローブタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベローブタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を挙げることができる。例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を発現する細胞を用いて、本発明のRNP複合体を増幅させることができる。

本発明の複合体は、通常、(a) パラミクソ科ウイルスの少なくとも一つのエンベローブタンパク質を発現しないように改変されたパラミクソウイルスに由来する (一) 鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖をコードするベクターDNAを、エンベローブタンパク質を発現する細胞 (ヘルパー細胞) に導入して発現させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清または細胞抽出物からRNP複合体を回収することにより調製することができる。ベクターDNAを発現させる時に、NP、L、およびPタンパク質を共発現させておくことでRNPが形成され、エンベローブタンパク質を持つウイルスが構築される。

ヘルパー細胞で発現させるベクターDNAは、本発明の複合体に含まれる (一) 鎖一本鎖RNA (ネガティブ鎖) またはその相補鎖 (ポジティブ鎖) をコードしている。細胞内で転写させる鎖は、ウイルスのポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよいが、ポジティブ鎖が転写されるようにすることが複合体の再構成の効率を上げるためには好ましい。例えば、(一) 鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖をコードするDNAをT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによりRNAに転写させる。

例えば、エンベローブ遺伝子が欠損した組換えセンダイウイルスゲノムを発現するプラスミドを、欠損したエンベローブ蛋白質を発現するベクターならびに、NP、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、RNP複合体を含むウイルスの再構成を行うことができる。また、例えば、F遺伝子が染色体に組込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。ウ

ウイルスゲノム以外から供給されるこれらの蛋白質群は、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。一般に、エンベロープタンパク質は、細胞傷害性や細胞の形態を変える作用により、長期的培養が困難な場合が知られているため、誘導性プロモーターの制御下にベクターの再構成時にのみ発現させることもできる（実施例参照）。

RNPまたはこれを含むウイルスが形成されれば、このRNPまたはウイルスを上記のヘルパー細胞に再度導入して培養することにより、本発明の複合体を増幅することができる。この過程は、(a) 本発明の複合体または該複合体を含むウイルスベクターを、エンベロープタンパク質を発現する細胞に導入する工程、および (b) 該細胞を培養し、その培養上清または細胞抽出物からウイルス粒子を回収する工程、を含む。

RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。

上記のようにして細胞においてウイルスベクターが構築されれば、この細胞を、エンベロープタンパク質を発現する細胞と共培養することにより、本発明の複合体または該複合体を含むウイルスベクターをさらに増幅することができる。このような方法としては、例えば実施例12に記載したように、ウイルスを産生する細胞にエンベロープタンパク質を発現する細胞を重ねる方法が好適である。

本発明の複合体は、例えば、免疫原性を低下させるために、また、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、複合体中のRNAにコードされるウイルス遺伝子が改

変されたものであってもよい。

本発明の複合体は、(一)鎖一本鎖RNA中に外来遺伝子をコードするRNAを含みうる。外来遺伝子としては、標的細胞中で発現させたい所望の遺伝子を用いることが可能である。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、複合体に含まれるRNAをコードするベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p.4822-4830)。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の前または後ろに挿入することができる (実施例参照)。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S 配列 (転写開始配列-介在配列-転写終結配列) またはその部分を挿入する。挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類により調節することができる。また、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置が (一) 鎖RNAの3' 端に近いほど (野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子をNP遺伝子の上流 (マイナス鎖においては3' 側) またはNP遺伝子とP遺伝子の間に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5' 端に近いほど (野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど)、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5' 側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5' 隣接部位)、またはL遺伝子の上流 (ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3' 隣接部位) に外来遺伝子を挿入する。外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは

、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。ゲノムをコードするベクターDNA中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。本発明の複合体中のRNAゲノムは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。

外来遺伝子を有する組換えセンダイウイルス由来のRNP複合体を含むウイルスベクターは、例えば、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ $\mu$ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子をNotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)(E I S配列)のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側合成DNA配列及びリバーズ側合成DNA配列(アンチセンス鎖)を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために5'側に任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGCG、GCCのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または

9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCG、GCCのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのEIS塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール (rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998)。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCT-3'、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCTTACTACGG-3'、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、エンベロープ遺伝子を欠損するゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

ウイルスゲノムをコードするベクターDNAは、これを試験管内または細胞内で転

写させ、ウイルスのL、P、NPタンパク質により、RNPを再構成させ、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。ベクターDNAからのウイルスの再構成は、エンベロープタンパク質を発現する細胞を用いて、公知の方法に従って行うことができる（国際公開97/16539号；国際公開97/16538号；Durbin, A.P. et al., 1997, Virology 235: 323-332；Whelan, S.P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392；Schnell, M.J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203；Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784；Lawson, N.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481；Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094；Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579；Baron, M.D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271；Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404）。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子や他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させ、複合体を含むウイルスを増幅することが可能である。

ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貪食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham,

F.L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO<sub>2</sub>、35°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30  $\mu$ g/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W.  $5 \times 10^5$ ) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬に適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられる。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質 (100 units/ml ペニシリンGおよび100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を含む最少必須培地 (MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1  $\mu$ g/ml psoralen (ソラレン) 存在下 UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルス $\nu$ TF7-3 (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間が適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 $\mu$ g、より好ましくは3~5 $\mu$ gの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド (24-0.5 $\mu$ gのpGEM-N、12-0.25 $\mu$ gのpGEM-P、および24-0.5 $\mu$ gのpGEM-L、より好ましくは1 $\mu$ gのpGEM-N、0.5 $\mu$ gのpGEM-P、および1 $\mu$ gのpGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にSuperfect (QIAGEN社) を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 $\mu$ g/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは40 $\mu$ g/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma) のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、エンベローブタンパク質を発現するLLC-MK2細胞にトランスフェクションして培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。あるいは、NP、L、P発現プラスミドを初めからエンベローブタンパク質を発現するLLC-MK2細胞にトランスフェクションするか、またはエンベローブ発現プラスミドを共にトランスフェクションすれば、感染性ウイルスベクターをより効率良く得ることができる。この細胞は、エンベローブタンパク質を発現するLLC-MK2細胞に重層して培養することによってウイルスベクターを増幅することができる (実施例参照)。培養上清に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579) により決定することができる。得られたウイルスストックは-80°Cで保存することができる。

RNP複合体またはウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞

は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクターまたはRNP複合体の再構成においては、サル腎由来のCV-1細胞やLLC-MK2細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープタンパク質を発現させることで、そのエンベロープを有する感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、例えばエンベロープ遺伝子を発現するベクターと共に上記の宿主から得られたRNPまたはウイルスベクターを発育鶏卵に接種し、ウイルスを増幅させることができる。または、エンベロープタンパク質遺伝子が組み込まれたトランスジェニック鶏卵を用いてウイルスベクターを生産することも可能である。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。エンベロープタンパク質を発現するベクターと共にセンダイウイルスベクターまたはRNP複合体を漿尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ漿尿液を回収する。漿尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73, (1995)）。

エンベロープタンパク質を発現するベクターとして、本発明の複合体、または本発明の複合体を含むウイルスベクター自体を用いることが考えられる。例えば、ゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のRNP複合体を同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方の複合体からの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスが増幅される。すなわち、2種類またはそれ以上の本発明のRNP複合体またはそれを含むウイルスベクターを、

エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウィルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。このようにして生産された混合ウィルスは、ワクチン等にも有用である。また、これらのウィルスは、エンベロープ遺伝子が欠損している分、エンベロープ遺伝子を欠損していないウィルスに比べゲノムサイズが小さくなり、長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウィルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

ウィルスからの本発明のRNPの調製は、例えば、以下のように超遠心法を利用して行なうことができる。ウィルス粒子を含むろ液にtritonX-100を終濃度0.5% となるように加え、これを室温で10~15分放置し、その上澄みを10~40%ショ糖勾配の上に重層し、20,000~30,000rpmで30分遠心し、RNPを含む画分を回収する。

あるいは、ウィルスを0.6% NP40、1%のデオキシコール酸ナトリウム、1M KCl、10mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、10mM Tris HCl (pH7.4)、5mM EDTA (終濃度) に溶かす。20°Cで20分放置し、11,000 $\times$ gで20分間遠心する。RNPを含む上澄みを50%グリセロール、0.2% NP40、30mM NaCl、10mM Tris HCl、1mM EDTA に重層し、39,000rpm、2時間、4°Cで遠心して沈殿を回収する。沈殿に含まれるRNP複合体は、0.5% Triton X-100 を含む溶液に再度分散させ、10~40%ショ糖勾配に重層し、20,000~30,000 rpm で 30分遠心し、RNPを含む単一のバンドを回収することにより高度に精製することが可能である。

本発明の複合体は、例えば生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) など適宜希釈して組成物とすることができる。本発明の複合体を鶏卵で増殖させた場合等においては漿尿液を含むこともできる。本発明の複合体を含有する組成物には、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の生理学的に許容しうる媒体を含んでもよい。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。

伝子発現、間接 (ex vivo) 投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。また、外来遺伝子として、感染症に関する細菌またはウイルスの抗原をコードする遺伝子を用いれば、これを動物に投与することにより、該動物において免疫を誘導することができる。即ちワクチンとして利用することができる。

ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対し適用することが考えられる。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提示細胞 (APC) に治療効果を有する遺伝子を発現させることができる。このような遺伝子としては、癌抗原 Muc-1 または Muc-1 様ムチンタンデムリピートペプチド (米国特許第 5,744,144号)、メラノーマ gp100 抗原などが挙げられる。このような遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2 と一本鎖 IL-12 との組み合わせ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15): 8591-8596, 1999)、ii) IL-2 とインターフェロン- $\gamma$  (米国特許第 5,798,100号)、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子 (GM-CSF)、iv) 脳腫瘍を治療対象とした GM-CSF と IL-4 の組み合わせ (J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)) などが挙げられる。

感染症の治療としては、インフルエンザにおいては、例えば強毒株 H5N1 型エンベロープ、日本脳炎においては、例えばエンベロープキメラ (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えば HIV gag または SIV gag タンパク質 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIV エンベロープタンパク質の経口投与による鎖クチン治療、ポリ乳酸-グリコール共重合体に包んでの投

外来遺伝子を挿入したRNAを含むRNPを調製すれば、遺伝子導入試薬を用いて、標的細胞に導入することができる。遺伝子導入試薬としてはカチオン性脂質またはカチオン性ポリマーが好適である。

カチオン性脂質には、例えば公表特許公報 平5-508626号において一般式 (I) で示される化合物が含まれる。カチオン性脂質は、好ましくは合成脂質化合物である。また、カチオン性脂質は、ジエーテル化合物またはジエステル化合物であってもよい。好ましくは、エーテル脂肪族である。具体的には、以下のような化合物が挙げられる：

DOGS (Transfectam™) またはDOTMA (Lipofectin™) (ジエーテル化合物)

DOTAP (ジエステル化合物)

DOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)

DOPC (ジオレオイルホスファチジルコリン)

DPRI ローゼンタール抑制因子 (RI) (DL-2,3-ジステアロイルオキシプロピル (ジメチル)  $\beta$ -ヒドロキシエチル臭化アンモニウム (Sigma) のジパルミトイル化誘導体

DORI 同上のジオレイル誘導体

カチオン性ポリマーは陽イオン高分子であり、好ましくは合成分子である。具体的には、ポリリジン、脂肪族ポリアミン、ポリエチレンイミンなどが挙げられる。

本発明複合体を上記のカチオン性脂質またはカチオン性ポリマーと混合して、遺伝子導入用組成物とすることができる。この遺伝子導入用組成物には、適宜生理食塩水などの溶媒、および塩、安定剤などの溶質を組み合わせることができる。本発明の遺伝子導入用組成物を細胞に添加することにより、細胞に本発明の複合体を導入して複合体に含まれるRNAから遺伝子を発現させることができる。

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いれば、遺伝子治療を行なうことが可能となる。本発明の複合体の遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺

与 (Kaneko, H. et al., Virology 267: 8-16 (2000))、コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット (CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8, Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8):949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000)) などが挙げられる。

また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドの発現が行われている (Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-94)。

#### 図面の簡単な説明

図1は、Cre-loxP誘導発現系によるF蛋白質の発現を解析したウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。化学発光法により抗SeV-F抗体と交叉のみられる該転写膜上の蛋白質の検出を行った結果を示す。

図2は、Cre-loxP系により発現を誘導したF蛋白質の細胞表面へのディスプレイを解析した結果を示す図である。抗SeV-F抗体を用いてLLC-MK2/F7のフローサイトメトリー解析を行った結果を示す。

図3は、発現されたF蛋白質のトリプシンによる解裂をウェスタンブロット法により確認した結果を示す写真である。

図4は、細胞表面におけるHNの発現を赤血球の細胞表面への吸着実験で確認した結果を示す写真である。

図5は、欠失タンパク質発現細胞を用いて欠失型ウイルスの回収を試みた結果を示す写真である。F欠損SeVの再構築時に用いたワクシニアウイルスによりヘルパー細胞株からのF蛋白発現が素早くシャットオフしたことが判明した。

1. LLC-MK2およびCV-1はそれぞれの細胞株のみの細胞ライセートを指す。

2. LLC-MK2/F+adおよびCV-1/F+adはアデノウイルスAxCANCreを加えたそれぞれの誘導発現細胞ライセートを指す。
3. LLC-MK2/F-adおよびCV-1/F-adはアデノウイルスAxCANCreを加えていないそれぞれのF遺伝子導入株の細胞ライセートを指す。
4. LLC-MK2/F+ad 3rdはアデノウイルスAxCANCreで誘導発現した細胞をさらに3回継代した細胞のライセートを指す。
5. 1dおよび3dはそれぞれ誘導発現後1日および3日を指す。
6. Vac1dおよびVac 3dはそれぞれワクシニアウイルス感染後1日および3日の細胞を指す。
7. AraC1dおよびAraC3dはそれぞれAraCを添加して1日および3日の細胞を指す。
8. CHX 1dおよびCHX 3dはそれぞれ蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加して1日および3日の細胞を指す。

図6は、GFP導入F欠失SeV cDNA(pSeV18<sup>+</sup> / $\Delta$ F-GFP)をF非発現LLC-MK2細胞にトランスフェクションしてGFPの発現(RNPの検出)を観察した結果を示す写真である。対照群としてF遺伝子をNP遺伝子の3'末端にシャフルし、F欠失部位にGFPを導入したSeV cDNA(Fシャフル型SeV)を用いた。「all」はSeV cDNAの他に、NP,P,L遺伝子を発現するプラスミド(pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/L)も同時にトランスフェクションしたものを表わす。「cDNA」はcDNA(pSeV18<sup>+</sup> / $\Delta$ F-GFP)のみのトランスフェクションを表わす。RNPトランスフェクションはGFPを発現しているP0細胞を回収し、OptiMEM (GIBCO BRL)に懸濁し(10<sup>7</sup> 細胞/ml)、凍結融解3回くり返したライセート100 $\mu$ lをカチオン性リボソームDOSPER(ベーリンガーマインハイム)25 $\mu$ lと混合し、室温に15分間放置してから、F発現誘導細胞(+ad)に添加し、RNPトランスフェクションを行った。細胞の対照群としてCre DNAリコンビナーゼを発現する組換えアデノウイルス非添加(-ad)細胞を用いた。その結果、P0のLLC-MK2細胞ではGFPはSeVウイルスRNPの形成に依存的に発現することが判明し、

P1では、F欠失ウイルスはF誘導発現に依存的に増幅されることが判明した。

図7は、F欠失ゲノムcDNAで再構築された機能的なRNPが、F発現ヘルパー細胞でレスキューされ、感染性を有する欠失型ウイルスビリオンを形成し得るかを調べた結果を示す写真である。RNP/oはRNPを重層 (overlay) した細胞を指し、RNP/tはRNPをtransfectionした細胞を指す。

図8は、F欠失ウイルスが、F発現細胞に特異的に増幅されることを確かめた結果を示す写真である。遺伝子欠失型ゲノムから構築した機能的RNPを含むライセートを実施例2に記載のF発現細胞にリポフェクションし、培養上清を回収した。この培養上清をF発現細胞の培地に加え感染させ、3日目に回収された培養上清を、F発現細胞とF非発現細胞に同時に添加し、トリブシン存在と非存在下で3日間培養した。その結果を示す。F発現細胞では、トリブシン存在下でのみウイルスが増幅された。

図9は、F発現細胞に導入した場合に特異的にF欠失ウイルスが培養上清に放出されることを確かめた結果を示す写真である。遺伝子欠失型ゲノムから構築した機能的RNPを含むライセートを実施例2に記載のF発現細胞にリポフェクションし、培養上清を回収した。この培養上清をF発現細胞の培地に加え感染させ、3日目に回収された培養上清を、F発現細胞とF非発現細胞に同時に添加し、トリブシン存在と非存在下で3日間培養した。下段はF非発現細胞の上清の場合の結果を示す。

図10は、F欠失cDNAから回収されたビリオンのゲノム構造を確認するため、F発現細胞の培養上清中のウイルスを回収し、total RNAを抽出して、FとHNをプローブにしてノーザンブロット解析を行った結果を示す写真である。F発現細胞から回収されたウイルスはHN遺伝子は検出されたがF遺伝子は検出されず、F遺伝子がウイルスゲノム上に存在しないことが明らかとなった。

図11は、GFPの遺伝子はcDNAの構築の際と同様のFの欠失部位に存在することを示すRT-PCRの結果を示す写真である。1: +18-NP、+18 Not Iサイトの存在の確

認。2 : M-GFP、GFP遺伝子がF遺伝子欠損部位に存在することの確認。3 : F遺伝子、F遺伝子の存在の確認。野生型SeVとF欠損GFP発現SeVのゲノム構造を上にした。GFP遺伝子がF欠損部位に存在し、NPの3'末端に+18由来のNotIサイトがあり、F遺伝子がRNAゲノムのどこにも存在しないことが確認された。

図12は、ウイルスのFとHNに特異的に反応する金コロイド結合IgG(antiF, antiHN)を用いた免疫電顕により調べた結果を示す写真である。ウイルスのエンベロープのスパイク様構造はFとHNの蛋白質からなることが明らかとなった。

図13は、GFPの遺伝子以外の他の遺伝子の構造は野生型と同様であることを確認したRT-PCRの結果を示す図である。

図14は、F欠失ウイルス粒子を電顕により、その形態を調べた結果を示す写真である。F欠失ウイルス粒子は野生型ウイルスと同様に内部にヘリカルなRNP構造とスパイク様構造を有していた。

図15は、F欠失型SeVベクターによるin vitroでの多様な細胞への高効率遺伝子導入の結果を示す写真である。

図16は、マウス初代骨髄細胞 (BM c-kit+/-) へのF欠失型SeVベクターの導入を解析した結果を示す図である。白抜きバーはPE陽性/GFP陰性を指し、黒いバーはPE陽性/GFP陽性を指す。

図17は、ラット脳室へのベクターの in vivo 投与の結果を示す写真である。

図18は、F発現細胞から回収したF欠損SeVウイルスを含む培養上清をF非発現LLC-MK2細胞に感染し、トリブシン存在下または非存在下で3日間培養し上清中のウイルスの存在をHA assayで確認した結果を示す写真である。

図19は、図18Bにおいて発育鶏卵でHA陽性であった漿尿液(lane 11およびlane 12)を発育鶏卵に再接種して培養2日後の漿尿液のHA assayを行った結果を示す写真である。

図20は、HA陽性で感染性がないウイルス液を免疫電顕で調べた結果を示す写

真である。ウイルス粒子が確認され、ビリオンのエンベロープは金コロイド標識したHN蛋白を認識する抗体では反応したが、金コロイド標識したF蛋白を認識する抗体では反応しなかった。

図2 1は、F欠損ウイルス粒子の細胞へのトランスフェクションの結果を示す写真である。

図2 2は、F、HN共発現細胞の造成をウエスタンブロットにより調べた結果を示す写真である。LLC/VacT7/pGEM/FHNはLLC-MK2細胞にワクシニア感染後、pGEM/FHNプラスミドをトランスフェクションした細胞。LLC/VacT7はワクシニア感染したLLC-MK2細胞。LLCMK2/FHNmixはF、HN遺伝子導入されたLLC-MK2細胞でクロニングしていない細胞。LLC/FHNはLLC-MK2細胞にF、HN遺伝子を導入してアデノウイルスで発現誘導後(3日後)の細胞、1-13、2-6、2-16、3-3、3-18、3-22、4-3、5-9はクロニングしたときの細胞株の番号(名前)を指す。

図2 3は、pGEM/FHNの添加の有無の違いによるウイルスの形成を確認した結果を示す写真である。FHN欠損GFP発現SeV cDNA, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/FHNをそれぞれ混合しLLC-MK2細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入3時間後培地をAraC, トリプシン入りのMEMに交換し、さらに3日間培養した。遺伝子導入後2日目で蛍光実体顕微鏡で観察し、pGEM/FHNの添加の有無の違いを検証し、GFP発現細胞の広がり度でウイルスの形成を確認した。その結果を示す。再構築時にpGEM/FHNを添加した場合はGFP発現細胞の広がりが確認され、pGEM/FHNの添加がない場合はGFP発現はシングル細胞でしか観察されなかった

図2 4は、RNPトランスフェクションによるF、HN欠損ウイルスの再構築と増幅を示す写真である。発現誘導後3日目のF HN共発現細胞(12well)にP0 RNPを重層またはDOSPERを用いてリポフェクションし、4日後にGFPを観察した。RNPトランスフェクションの場合はF欠損と同様にP1のFHN発現細胞でウイルスの回収に成功した(上)。Ade/Creを感染して6時間以後にFHN蛋白が誘導発現された細胞にFHN欠損ウイルス液を感染し増幅ができたことを確認した(下)。

図 2 5 は、FHN欠損GFPを発現するcDNAから再構築されたウイルス液はLLC-MK2, LLC-MK2/F, LLC-MK2/HN, LLC-MK2/FHNに感染してトリプシンの添加の有無で培養した結果を示す写真である。培養3日後にGFP蛋白発現細胞の広がりを確認した。その結果を示す。LLC-MK2/FHNでのみGFPの広がりが観察され、このウイルス液は、FHN共発現に特異的かつトリプシン依存的に増幅されることが確認された。

図 2 6 は、F H N発現細胞の培養上清由来R N Aのゲノム構造を確認した結果を示す写真である。

図 2 7 は、F H N欠損ウイルスで感染したF発現細胞の培養上清由来R N Aのゲノム構造の確認の結果を示す写真である。

図 2 8 は、ソラレン・UV照射におけるソラレンの濃度を変化させたときの、ワクシニアウイルスの不活性化とT7活性を示す図である。

図 2 9 は、ソラレン・UV照射におけるUV照射時間を変化させたときの、ワクシニアウイルスの不活性化とT7 RNAポリメラーゼ活性を示す図である。

図 3 0 は、ソラレン・UV照射したワクシニアウイルスの細胞傷害性 (CPE) を示す写真である。3×10<sup>5</sup>のLLC-MK2細胞を6ウェルプレートに播いた。細胞を一晩培養後、ワクシニアウイルスをmoi=2で感染させた。24時間後、CPEを測定した。偽処理のワクシニアウイルスによるCPEはA、15、20、および30分間処理したワクシニアウイルスによるCPEは、それぞれB、C、およびDに示した。

図 3 1 は、ワクシニアウイルスのUV処理時間のセンダイウイルス再構成効率に対する影響を示した図である。

図 3 2 は、センダイウイルス再構成実験に用いた細胞に残存する複製可能なワクシニアウイルスの力価を示す図である。

図 3 3 は、抗VSV-G抗体によるウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図 3 4 は、抗VSV-G抗体を用いたフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。AxCANCre感染4日目のLLC-MK2 VSV-G誘導発現株 (L1) (moi=0, 2.5, 5) の解

析結果を示す。一次抗体は抗VSV-G抗体 (MoAb I-1)、二次抗体はFITC化 抗マウス Igを用いた。

図 3 5 は、AxCANCre の感染量 (MOI=0、1.25、2.5、5、10) を変え、一定量のF 遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウイルスを感染後上清を回収し、さらにVSV-G 誘導前(-)、誘導後(+)の細胞に感染させ、5 日目のGFP の発現している細胞を観察した結果を示す写真である。

図 3 6 は、経時的にウイルス産生量を調べた結果を示す写真である。

図 3 7 は、VSV-G 発現株を用いて得られたF 遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウイルスおよびFHN欠損センダイウイルスを抗VSV抗体で処理し、感染性が影響されるを調べた結果を示す写真である。

図 3 8 は、GFP遺伝子を含むF、HN 欠失型センダイウイルスを VSV-G遺伝子発現細胞LLCG-L1に感染させ、VSV-Gを外被に有するシュードタイプウイルスの産生が見られるかを GFP遺伝子の発現を指標に調べた結果を示す写真である。

図 3 9 は、VSV-G 遺伝子発現細胞で増殖したウイルスが Fおよび HN 欠失型であることを、感染細胞抽出液のタンパク質のウェスタン解析により調べた結果を示す写真である。

図 4 0 は、蛍光顕微鏡下でGFP発現細胞を観察した結果を示す写真である。

図 4 1 は、エンベロープ発現プラスミドと細胞重層の組み合わせによるSeV/ $\Delta$ F-GFPの再構成効率の向上を示す図である。P0 (継代前) のd3~d4 (3日目~4日目) において、著しい改善が認められた。

図 4 2 は、エンベロープ発現プラスミドと細胞重層の組み合わせによるSeV/ $\Delta$ F-GFPの再構成の処理条件の検討結果を示す図である。GFP陽性細胞は再構成されたウイルス量を表す。

図 4 3 は、cDNAからのF欠損センダイウイルスのレスキューの検討結果を示す図である。エンベロープ発現プラスミドと細胞重層の組み合わせによるSeV/ $\Delta$ F-GFPの再構成効率の向上を示す。7日目は全チャレンジとも陽性となるが、成功確率の

中程度領域である3日目に着目し、効率の検討を行った。

図44は、GFPを含まないLacZ搭載 F 欠失型センダイウイルスベクターのlacZの発現を示す写真である。

図45は、センダイウイルスゲノムcDNA断片のサブクローニング (A) と新たにNotIサイトを導入し構築した5種類のセンダイウイルスゲノムcDNAの構造 (B) を示す図である。

図46は、SEAPにNotIサイト、転写開始シグナル、介在配列、転写終結シグナルを付加するためのクローニング用プラスミドの構造を示す図である。

図47は、各センダイウイルスベクターのブランクアッセイの結果を示す写真である。LAS1000で取り込んだブランクアッセイの蛍光画像の一部を示す。

図48は、各センダイウイルスベクター間におけるレポーター遺伝子 (SEAP) の発現量の違いを比較した結果を示す図である。SeV18+/SEAPのデータを100としてそれぞれ相対値を表した。SEAP遺伝子が下流に位置するに従ってその活性すなわち発現量が低下していくことがわかった。

図49は、P1 FHN共発現細胞におけるGFP発現を示す顕微鏡写真である。

図50は、VSV-GシュードタイプSeV/ $\Delta$ F:GFP感染細胞の抽出液を、抗F抗体 (anti-F)、抗HN抗体 (anti-HN)、抗センダイウイルス抗体 (anti-SeV) を用いてウェスタンブロット解析を行った結果を示す写真である。

図51は、中和抗体 (VGV抗体) の存在下または非存在下でFおよびHNを欠損したVSV-GシュードタイプSeVを感染させた細胞のGFPの蛍光を示す写真である。

図52は、密度勾配超遠心法を用いて分画したF遺伝子あるいはF, HN遺伝子を欠失したゲノムを有するVSV-Gシュードタイプセンダイウイルスのウェスタン解析の結果を示す写真である。

図53は、F遺伝子を欠損したゲノムを有するセンダイウイルス、あるいはF遺伝子またはF, HN遺伝子を欠失したゲノムを有するVSV-Gシュードタイプセンダイウイルスによる赤血球凝集反応を示す写真である。

図5 4は、F遺伝子を欠失したゲノムを有するセンダイウイルスまたはVSV-Gシェードタイプセンダイウイルスによる培養細胞への感染特異性を示す図である。

図5 5は、NGF発現を搭載したF欠失型センダイウイルス (NGF/SeV/ $\Delta$ F) の構造の確認を示す写真である。

図5 6は、NGF搭載F欠失型SeV感染細胞より発現されるNGFの活性を示す図である。ニワトリの後根神経節の初代神経細胞分散培養系に、培養開始と同時にSeV感染細胞の培養上清希釈液或いはコントロールとしてのNGF蛋白を添加し、3日後にミトコンドリアによる還元活性を指標として生細胞を定量した (n=3)。培養上清は1/1000希釈相当量添加した。

図5 7は、NGF搭載F欠失型SeV感染細胞より発現されるNGFの活性を示す写真である。ニワトリの後根神経節の初代神経細胞分散培養系に、培養開始と同時にSeV感染細胞の培養上清希釈液或いはコントロールとしてのNGF蛋白を添加し、3日後に検鏡した。

- A) コントロール (NGF添加無し)、
- B) NGF蛋白10ng/mL添加、
- C) NGF/SeV感染細胞培養上清1/100希釈添加、
- D) NGF/SeV感染細胞培養上清1/100希釈添加、
- E) NGF/SeV/ $\Delta$ F感染細胞培養上清1/100希釈添加、
- F) NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP感染細胞培養上清1/100希釈添加

図5 8は、Ad-CreのmoiとF蛋白の発現量を示す写真である。

図5 9は、Adeno-CreによるLLC-MK2/Fの発現を示す写真である。

図6 0は、継代による発現の持続性を示す写真である。

図6 1は、継代によるF蛋白の局在化を示す写真である。

図6 2は、GFP-CIUと抗SeV-CIUとの相関関係を示す図である。

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 F欠失型センダイウイルスの構築

＜1＞ F欠失型SeVゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup> b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) (「pSeV18<sup>+</sup> b(+)」は「pSeV18<sup>+</sup>」ともいう) のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてともいうプラスミドpUC18/KSとした。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行った。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF (ATG-TGA=1698bp) を除いてatgcatgccggcagatga (配列番号: 1) で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF) を構築した。PCRは、Fの上流には (forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/配列番号: 2, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/配列番号: 3)、F遺伝子の下流には (forward: 5'-atgcatgccggcagatga/配列番号: 4, reverse: 5'-tggtggaatgagagatcagc/配列番号: 5) のPCR産物をEcoT22Iで連結した。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F欠損部位を含む領域の断片 (4931bp) を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとした。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔFを得た。

さらに、F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP) を構築するため、PCRにより、EGFP遺伝子の増幅を行った。EGFP遺伝子を6の倍数(Hausmann, S. et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)) に合わせるため 5'はNsiI-taildプライマー(5'-atgcatatggtgatgcggttttggcagtac: 配列番号: 6)、3'はNgoMIV-tailedプライマー(5'-Tgccggctattattacttgtacagctcgctc: 配列番号: 7)を用いてPCRを行った。PCR産物を制限酵素NsiI とNgoMIVで消化してゲルから断片を回収し、pUC18/dFSSのF欠失部位にあるNsiI とNgoMIVという制限酵素部位に連結し、シー

クエンスを確認した。ここから、EGFP遺伝子を含むDraIII断片を回収し、pSeV18<sup>+</sup>のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP を得た。

一方、F 遺伝子を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV F遺伝子をPCRで増幅し、シーケンスを確認した後、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミド pCALNdLw(Arai ら, J. Virology 72, 1998, p1115-1121)のユニークサイト SwaI部位に挿入し、プラスミド pCALNdLw/Fとした。

#### <2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

F欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立した。細胞はSeVの増殖によく用いられているモンキー腎臓由来細胞株、LLC-MK2細胞を用いた。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 μg/mlを添加したMEMで37°C、5% CO<sub>2</sub>で培養した。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミド pCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法 (mammalian transfection kit (Stratagene)) により、そのプロトコールに従ってLLC-MK2 細胞に遺伝子導入を行った。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 μgのプラスミド pCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で24時間培養した。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL)を1200 μg/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行った。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて30株を回収した。各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培

養を続けた。

各クローンについてCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルスAxCANCreで感染後、抗SeV-F蛋白質モノクローナルIgG (f236, J. Biochem. 123: 1064-1072) を用いてSeV-F蛋白の発現をウエスタンブロット法により以下のように調べた。

各クローンは6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J Virol 72, 1115-1121 (1998)) により moi=3 で感染後、3日間培養した。該細胞は培養上清を取り除いた後、PBS緩衝液で2回洗浄し、スクレーパーで細胞をはがし、 $1500 \times g$ で5分間遠心し、細胞を集めた。

該細胞は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、必要に応じて解凍して使用することができる。集めた細胞は $150 \mu\text{l}$  PBSバッファーに懸濁後、同量の $2 \times \text{Tris-SDS-BME sample loading buffer}$  ( $0.625\text{M}$  Tris, pH 6.8, 5% SDS, 25% 2-ME, 50% glycerol, 0.025% BPB, Owl社製) を加え、 $98^{\circ}\text{C}$  3分間加熱処理後電気泳動用試料に供した。該試料 (1レーン当たり $1 \times 10^5$  細胞) をSDS-ポリアクリルアミドゲル (マルチゲル10/20、第一化学社製) を用い、電気泳動により分画し、分画された蛋白はセミドライブロット法によりPVDF転写膜 (Immobilon-P transfer membranes, Millipore社製) に転写した。転写は100% メタノールに30秒、水に30分間浸した転写膜を使用し、 $1\text{mA}/\text{cm}^2$  定電流の条件で1時間行った。

該転写膜を0.05% Tween20, 1% BSAを添加したブロッキング溶液 (ブロックエース、雪印社製) 中で1時間振蕩後、0.05% Tween20, 1% BSAを添加したブロッキング溶液で1/1000希釈した抗SeV-F抗体 (f236) で室温で2時間反応させた。該転写膜を3回20mlのPBS-0.1% Tween20に5分間振蕩して洗浄した後、PBS緩衝液で5分間振蕩し洗浄した。該転写膜を0.05% Tween20, 1% BSAを添加したブロッキング溶液で1/2000希釈したパーオキシダーゼで標識した抗マウスIgG抗体 (Goat anti-mouse IgG, Zymed社製) 10mlを室温で1時間反応させた。該転写膜を3度20mlの

PBS-0.1%Tween20に5分間振蕩して洗浄した後、PBS緩衝液で5分間振蕩し洗浄した。

化学発光法 (ECL western blotting detection reagents, Amersham社製) により抗SeV-F抗体と交叉のみられる該転写膜上の蛋白質の検出を行った。結果は図1に示す。AxCANCRe感染特異的なSeV-Fの発現が検出され、SeV-F遺伝子産物を誘導発現するLLC-MK2細胞の作出が確認された。

得られた数細胞株の内の一つのLLC-MK2/F7細胞を抗SeV-F抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った (図2)。すなわち、 $1 \times 10^5$ 細胞を15,000rpm 4℃で5分間スピンドウンし、PBS 200 $\mu$ lで洗浄し、100倍希釈した抗Fモノクローナル抗体 (f236)、0.05%アジ化ナトリウム、2%FCSを含むFACS用PBS (日研化学) で4℃、1時間遮光して反応させた。再び15,000rpm 4℃で5分間スピンドウンし、PBS 200 $\mu$ lで洗浄し、FITC標識した抗マウスIgG (CAPPEL社) 1 $\mu$ g/mlと30分間氷上で反応させ、再びPBS 200 $\mu$ lで洗浄し、15,000rpm 4℃で5分間遠心して細胞をスピンドウンし、1mlのFACS用PBSに懸濁した。EPICS ELITE (コールター社製) アルゴンレーザーを用いて、励起波長488nm、蛍光波長525nmで解析した。その結果、LLC-MK2/F7 では SeV-F遺伝子誘導発現時特異的に抗体との高い反応性が検出され、SeV-F蛋白質が細胞表面に発現されることが確認された。

#### 【実施例2】 ヘルパー細胞で発現されたSeV-Fタンパク質の機能確認

ヘルパー細胞で誘導発現されたSeV-F蛋白質は従来の蛋白機能が保たれているかを調べた。

LLC-MK2/F7細胞を6cmシャーレに蒔き、コンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCReを斉藤らの方法 (上記) によりmoi=3で感染後、トリプシン (7.5 $\mu$ g/ml, GIBCOBRL)を含むMEM (serum free)で37℃ 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで3日間培養した。

該細胞は培養上清を取り除いた後、PBS緩衝液で2回洗浄し、スクレーパーで細胞をはがし、1500 $\times$ gで5分間遠心し、細胞を集めた。前述したウエスタンブロッ

ト法により発現されたF蛋白質のトリプシンによる解裂を確認した(図3)。SeV-F蛋白質は非活性型の前駆蛋白のF0として合成され、トリプシンの蛋白分解作用により、F1とF2の2つのサブユニットに解裂し活性化される。このようにF蛋白が誘導発現後のLLC-MK2/F7細胞は普通の細胞同様に継代してもF蛋白が持続的に発現し、発現されたF蛋白による細胞傷害性が観察されず、F蛋白発現細胞同士での細胞融合も観察されなかった。しかし、このF発現細胞にSeV-HN発現プラスミド(pCAG/SeV-HN)をトランスフェクションしてトリプシンを含むMEMで3日間培養すると、細胞間の融合が多く観察された。細胞表面におけるHNの発現は赤血球の細胞表面への吸着実験(Hematoadsorption assay; Had assay)で確認した(図4)。すなわち、培養細胞に1%ニワトリ赤血球を1ml/dishを加え、4°Cで10分間静置した後、細胞をPBS緩衝液で3回洗浄したところ、細胞表面の赤血球のコロニーが観察された。赤血球凝集した細胞で細胞融合が観察され、F蛋白はHNと相互作用して細胞融合を引き起こしたことが判明し、LLC-MK2/F7で持続発現しているF蛋白は従来の機能を保っていることが示された。

### 【実施例3】 F欠失型ゲノムを持つ機能的RNPおよびビリオンの形成

欠失型ウイルスの回収ではビリオンの回収は欠失タンパク質発現細胞を使う必要がある。ところが、欠失タンパク質発現細胞を用いて欠失型ウイルスの回収を試みたところ、F欠損SeVの再構築時に用いたワクシニアウイルスによりヘルパー細胞株からのF蛋白発現が素早くシャットオフしたことが判明し(図5)、ヘルパー細胞株から直接のF蛋白の供給によるウイルスの再構成に成功しなかった。ワクシニアウイルスに対するソラレン(psoralen)添加で長波長紫外線(long-waveUV)での処理(PLWUV処理)は、ワクシニアウイルスの複製能力を失活させ、T7発現活性が損なわれないことが報告されている(Tsungら、J Virol 70,165-171、1996)。そこで、このPLWUV処理したワクシニアウイルス(PLWUV-VacT7)を用いてウイルスの再構築を試みた。紫外線照射装置は、15ワットバルブを5本が装備された UV Stratakinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V)、ストラタジーン社、La Jolla,

CA, USA) を用いた。その結果、再構築に用いた F 発現細胞から F 蛋白の発現は阻害されたものの、この PLWUV-VacT7 で再構築した細胞の lysate をヘルパー細胞へ感染しても araC の存在下ではワクシニアが殆ど増殖せず、ヘルパー細胞株からの F 蛋白発現にも殆ど影響しないことが判明した。さらに、この PLWUV-VacT7 を用いた組み換え野生型 SeV の再構築では従来が  $10^5$  以上の細胞がないとウイルスが回収されなかったのに対し、 $10^3$  の細胞からもウイルス回収が可能となり、ウイルスの再構築の効率が大きく改善された。この方法を用いて、F 欠失 SeV ウイルスの再構築を試みた。

#### < F 欠失 SeV ウイルスの再構築及び増幅 >

F 欠損部位に enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子をレポーターとして 6 nルールに従って導入した上記 pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP を下記のようにして LLC-MK2 細胞にトランスフェクションして GFP の発現を観察した。この時 RNP 形成に必要な構成要素である、3 つのウイルス由来遺伝子 NP、P、L の有無による影響も検討した。

LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish で 100mm ペトリ皿に蒔き、24 時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理し、T7 RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) に室温で 1 時間感染させた (moi=2) (moi=2~3、好適には moi=2 が用いられる)。細胞を 3 回洗浄してからプラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及び pGEM/L (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ  $12 \mu\text{g}$ ,  $4 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$ , 及び  $4 \mu\text{g}$  /dish の量比で OptiMEM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent ( $1 \mu\text{g}$  DNA/ $5 \mu\text{l}$  の SuperFect, QIAGEN) を入れて混合し、室温で 10 分間放置後、最終的に 3% FBS を含む OptiMEM 3ml に入れ、細胞に添加して培養した。pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP の代わりに対照として野生型 SeV ゲノム cDNA (pSeV(+)) (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) を用いて同様の実験を行った。3 時間培養後、細胞を、血清を

含まないMEM で2回洗浄し、シトシン $\beta$ -D-アラビノフラノシド40 $\mu$ g/ml (AraC, Sigma), トリブシン7.5 $\mu$ g/ml (GIBCO) を含むMEMで70時間培養した。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁した (10<sup>7</sup> cells/ ml )。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim)と混合し (10<sup>6</sup>cells/25 $\mu$ l DOSPER) 室温で15分放置した後、F発現LLC-MK2/F7 細胞株にトランスフェクション (10<sup>6</sup>cells /well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM (40 $\mu$ g/ml AraC, 7.5 $\mu$ g/ml トリブシンを含む)で培養した。

その結果、ウイルス由来の3つの構成要素、NP、P、Lがすべて揃ったときにのみGFPの発現が認められ、外来遺伝子を発現する欠失ウイルスRNPが形成し得ることが判明した (図6)。

#### <F欠失型ビリオンの確認>

上記のようにしてF欠失ゲノムcDNAで再構築された機能的なRNPが、F発現ヘルパー細胞でレスキューされ、感染性を有する欠失型ウイルスビリオンを形成し得るかを調べた。前述したように機能的RNPを形成される条件 (pSeV18<sup>+</sup>/ $\Delta$ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/Lを同時にトランスフェクトする条件) と形成されない条件 (pSeV18<sup>+</sup>/ $\Delta$ F-GFP, pGEM/NPの2種のプラスミドのみをトランスフェクトする条件) で再構築を行った細胞を凍結/融解して得たライセートをカチオニックリポソームと混合しF発現細胞と非発現細胞にそれぞれリポフェクションし、これらの細胞におけるGFP発現細胞の広がりウイルス粒子の形成を観察した。その結果、機能的RNPが再構築された条件のライセートを用い、F発現細胞に導入した際にのみGFP発現細胞の広がりが観察された (図7)。さらに、ブランクアッセイにおいても、同様の条件でのみブランクの形成が観察された。これらの結果から、F欠損ウイルスゲノムから形成された機能的RNPがF発現細胞由来のFタンパク質の存在下で、さらに感染性ウイルス粒子として形成され、細胞外に放出されたことが明らかになった。

培養上清中の感染性F欠失型ビリオンの存在は以下の実験により証明された。F

遺伝子欠失型ゲノムから構築した機能的RNPを含むライセートを実施例2に記載のF発現細胞にリポフェクションし、培養上清を回収した。この培養上清をF発現細胞の培地に加え感染させ、3日目に回収された培養上清を、F発現細胞とF非発現細胞に同時に添加し、トリブシン存在と非存在下で3日間培養した。F発現細胞では、トリブシン存在下でのみウイルスが増幅された(図8)。F非発現細胞の上清(図9 下段)、またはトリブシン非存在下で培養したF発現細胞からは感染性を持たないウイルス粒子が放出されていることが明らかとなった。以上のことをまとめると、F欠損GFP発現ウイルスはF発現細胞に特異的かつトリブシン解裂に依存的に増幅されることが明らかとなった。このように増幅された感染性F欠失型セリダイウイルスのタイターは $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$  CIU/mlの範囲にあった。

#### 【実施例4】 F欠失型GFP発現ウイルスの解析

F欠失cDNAから回収されたビリオンのゲノム構造を確認するため、F発現細胞の培養上清中のウイルスを回収し、total RNAを抽出して、FとHNをプローブにしてノーザンブロット解析を行った。その結果F発現細胞から回収されたウイルスはHN遺伝子は検出されたがF遺伝子は検出されず、F遺伝子がウイルスゲノム上に存在しないことが明らかとなった(図10)。さらにRT-PCRによりGFPの遺伝子はcDNAの構築の際と同様のFの欠失部位に存在すること(図11)、また、他の遺伝子の構造は野生型と同様であることを確認した。以上のことからウイルス再構成中にゲノムの再編成は起きていないことが示された。また、回収されたF欠失ウイルス粒子を電顕により、その形態を調べた。F欠失ウイルス粒子は野生型ウイルスと同様に内部にヘリカルなRNP構造とスパイク様構造を有していた(図14)。さらに、ウイルスのFとHNに特異的に反応する金コロイド結合IgG(antiF, antiHN)を用いた免疫電顕により調べたところ、ウイルスのエンベロープのスパイク様構造はFとHNの蛋白質からなることが明らかとなり(図12)、ヘルパー細胞の生産するF蛋白質がこのビリオンに効率的に取り込まれていることがわかった。以下に詳述する。

<Total RNAの抽出、ノーザンブロット解析、およびRT-PCR>

F 発現細胞LLC-MK2/F7にウイルス感染して3日目の培養上清からQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用い、そのプロトコールに従いtotal RNAの抽出を行った。精製したtotal RNA (5 $\mu$ g) をホルムアルデヒドを含む1%変性アガロースゲルにて泳動分離してから、バキュームブロッティング装置 (Amersham Pharmacia 社)を用いHybond-N+メンブランにトランスファした。作成したメンブランは0.05MのNaOHで固定し、2倍希釈したSSC緩衝液 (Nacalai tesque) ですすいだ後、ハイブリダイゼーション溶液 (Boehringer Mannheim) で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。ジゴキシゲニン (DIG) -dUTP(アルカリ感受性) を用いたランダムプライムDNA標識法(DIG DNA Labeling Kit, Boehringer mannheim)により作成したFあるいはHN遺伝子のプローブを添加して16時間ハイブリダイズさせた。その後、メンブランを洗浄して、アルカリフォスフォターゼ標識抗DIG抗体 (anti-digoxigenin-AP)と反応させ、DIG detection kitを用いて解析した。その結果F発現細胞から回収されたウイルスはHN遺伝子は検出されたがF遺伝子は検出されず、F遺伝子がウイルスゲノム上に存在しないことが明らかとなった(図10)。

さらにRT-PCRにより詳細な解析を行った。RT-PCRは精製したウイルスRNAをSUPERSCRIPTII Preamplification System(Gibco BRL)を用い、そのプロトコールに従いfirst strand cDNA を合成し、LA PCR kit (TAKARA ver2.1)を用いて次のような条件でPCRを行った。94°C/3分反応後、94°C/45秒, 55°C/45秒, 72°C/90秒を1サイクルとして30サイクルを増幅して72°Cで10分間置き、2%アガロースゲルで100v/30分電気泳動してエチジウムブロマイド染色し、撮影した。M遺伝子とF欠失部位に挿入したEGFPの確認に用いたプライマーはforward 1 : 5'-atcagagacctgcgacaatgc (配列番号: 8), reverse 1 : 5'-aagtcgtgctgcttcatgtgg (配列番号: 9)、F欠失部位に挿入したEGFPとHN遺伝子の確認に用いたプライマーはforward 2 : 5'-acaaccactacctgagcaccagtc (配列番号: 10), reverse 2

: 5'-gcctaacacatccagagatcg (配列番号: 11)、さらに、M遺伝子とHN遺伝子との間はforward3: 5'-acattcatgagtcagctcgc (配列番号: 12) とreverse2プライマー (配列番号: 11) で行った。その結果、GFPの遺伝子はcDNAの構築の際と同様のFの欠失部位に存在すること (図11)、また、他の遺伝子の構造は野生型と同様であることを確認した (図13)。以上のことからウイルス再構成中にゲノムの再編成は起きていないことが示された。

#### <金コロイド免疫標識電顕解析>

回収されたF欠失ウイルス粒子を電顕により、その形態を調べた。まず、欠損型ウイルス感染細胞の培養上清を28,000rpm、30分間遠心してウイルスをペレットにした後で、 $1 \times 10^9$  HAU/mlになるように10倍希釈したPBSに再懸濁し、その一滴を支持膜付きのマイクログリット上に滴下して室温で乾燥させた。3.7%ホルマリンを含むPBSにより15分間固定処理後、0.1%BSAを含むPBS溶液で30分前処理をし、さらに同溶液で200倍希釈した抗Fモノクローナル抗体 (f236)、または抗HNモノクローナル抗体 (Miura, N. et al., Exp. Cell Res. (1982) 141: 409-420) を滴下して保湿状態で60分間反応させた。その後グリットをPBSで洗浄して、200倍希釈した金コロイド標識抗マウスIgG抗体を滴下して同じく保湿状態で60分間反応させた。続いてグリットをPBS、滅菌蒸留水の順で洗浄し室温で風乾後、グリットの上に4%の酢酸ウラニウム溶液で2分間染色し乾燥させた上、JEM-1200EXII 電子顕微鏡 (日本電子) を用いて観察、撮影した。その結果、ウイルスのエンベロープのスパイク様構造はFとHNのタンパク質からなることが明らかとなり (図12)、ヘルパー細胞の生産するFタンパク質がこのビリオンに効率的に取り込まれていることがわかった。また、F欠失ウイルス粒子は野生型ウイルスと同様に内部にヘリカルなRNP構造とスパイク様構造を有していた (図14)。

[実施例5] F欠失型SeVベクターによるin vitroでの多様な細胞への高効率遺伝子導入

<ラット大脳皮質神経細胞の初代培養細胞への導入>

ラット大脳皮質神経細胞の初代培養細胞を、以下のようにして調製し培養した。妊娠18日SDラット (SPF/VAF Crj: CD, 雌, 332g, ~9 週 Charles River) をジエチルエーテルにより深麻酔し、腋下動脈放血により安楽死させた。開腹し子宮から胎児を摘出し皮膚頭蓋を切り開き脳を取り出した。実体顕微鏡下で大脳半球を作業液 (5%ウマ血清と5%子牛血清、10%DMSOを含む) DMEMに移し、スライスして氷温冷却したパバイン溶液 (1.5U, シスチン0.2mg、ウシ血清アルブミン0.2mg、グルコース5mg、DNase 0.1mg/ml) を加え、32°Cで5分毎に転倒攪拌して15分間インキュベーションした。懸濁液が十分濁り、組織片が半透明になったことを確認して組織片がばらばらになるまでピペティングを繰り返した。32°Cにて1200rpm 5分間遠心した後、細胞をB27 supplement添加したneural basal medium (GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada) に再懸濁し、ポリ-d-リジン (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, U.S.A.) でコーティングされたプレート上に  $1 \times 10^5$  cells/dish 蒔き、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養を行った。

その大脳皮質初代培養神経細胞  $5 \times 10^5$ /well を5日間培養後、F欠失型SeVベクターを感染させ (moi=5)、さらに3日間培養した。1% パラホルムアルデヒド、5% ヤギ血清、0.5% Triton-Xを含む固定液で5分間室温で固定し、BlockAce (雪印乳業) にて室温2時間ブロッキングして500倍に希釈されたヤギ抗ラット microtubule-associated protein 2 (MAP-2) (Boehringer) IgGと室温で1時間インキュベーションした。PBS(-)で15分毎に3回洗浄後、5%ヤギ血清/PBSで100倍希釈されたcys3-結合抗マウスIgGと室温で1時間インキュベーションした。さらにPBS(-)で15分毎に3回洗浄後、細胞にVectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) を加え、共焦点顕微鏡 (Nippon Bio-Rad MRC 1024, Japan) で 470-500-nm または 510-550-nm の excitation band-pass filter を付けた Nikon Diaphot 300 倒立顕微鏡でMAP-2の免疫染色とGFPの蛍光による2重染色の蛍光観察を行った。その結果、MAP2 陽性神経細胞にはGFPがほぼ100%導入されたことが明らかとなった (図1.5)。

### <正常ヒト細胞への導入>

正常ヒト平滑筋細胞、正常ヒト肝細胞、正常ヒト肺毛細血管内皮細胞（セルシステムズ）は大日本製薬から購入し、SFM CS-C培地キット（セルシステムズ）で37°C、5% CO<sub>2</sub>で培養した。

正常ヒト平滑筋細胞（図15, Muscle）、正常ヒト肝細胞（図15, Liver）、正常ヒト肺毛細血管内皮細胞（図15, Lung）等のヒト正常細胞にF欠失型SeVベクターを感染して（m.o.i=5）、GFP発現を観察した。いずれの細胞においてもほぼ100%の導入効率で強力なGFP遺伝子発現をしていることが確認された（図15）。

### <マウス初代骨髓細胞への導入>

さらに、マウス初代骨髓細胞をリンネジマーカーで分離して、F欠失型SeVベクターを感染させる実験を行った。まず、C57BL マウス（6週令雄）に150mg/kg になるように5-fluorouracil (5-FU, Wako Pure Chemical Industries) を腹腔内注射(IP injection)し、投与2日後、大腿骨より骨髓細胞を回収した。Lympholyte-M (Cedarlane)を用いた密度勾配遠心によって単核細胞を分離した。3x10<sup>6</sup>の単核細胞に対し、ビオチン標識された抗CD45R (B220), 抗Ly6G (Gr-1), 抗Ly-76 (TER-119), 抗1 (Thy1.2), 抗Mac-1を結合させたストレプトアビジン磁気ビーズ（ファーマジェン社, フナコシ社）の混合したものを3×10<sup>7</sup>を加え4°Cにて1時間反応させ、磁石により、Lin<sup>+</sup>の細胞を除いた分画を回収した（Lin<sup>-</sup>細胞）(Erich, S. et al., Blood 1999. 93 (1), 80-86)。Lin<sup>-</sup>細胞4x10<sup>5</sup>細胞に対し、2x10<sup>7</sup> HAU/mlのSeVを加え、さらに、組換えラットSCF (100ng/ml, BRL), 組換えヒトIL-6 (100U/ml)を加えた。また8x10<sup>5</sup>のトータル骨髓細胞に対してF欠損SeV 4x10<sup>7</sup>HAU/ml、1x10<sup>6</sup>の細胞に対し5x10<sup>7</sup>HAU/mlのGFP-SeVを加えた。なお、GFP-SeVは、SeV転写ユニットpUC18/T7HVJRz.DNA(+18)(Genes Cells, 1996, 1:569-579)の制限酵素NotI開裂部位に、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子（構造遺伝子長717bp）に転写開始(R1)と終結(R2)シグナルと介在(IG)配列を付加したNotI断片をPCRにより増幅させ、導入して作製した。既知の方法(Genes Cells, 1996, 1:569-579)に

従い、LLC-MK2細胞および発育鶏卵を用いてGFP遺伝子を含むウイルスの再構築を行い、目的の遺伝子を含むウイルスを回収した。GFP-SeVを感染して48時間培養した後、細胞をそれぞれ2群に分け、一つにはフィコエリスリン (phycoerythrin) (PE) 標識抗-CD117 (c-kit、Pharmingen)を1時間反応させ、もう一群は対照群とした。3回PBSにて洗浄した後、フローサイトメータ(EPICS Elite ESP; Coulter, Miami, FL)による解析を行った。

その結果、血液のprimitive幹細胞のマーカーである抗c-kit抗体でエンリッチした骨髓細胞にもF欠失型SeVベクターは感染し、GFP遺伝子発現が観察された(図16)。培養上清中の感染性粒子の確認は、細胞培養上清をトリプシンで処理後、LLC-MK2細胞に添加し、3日後にGFP発現細胞の存在の有無により行った。これらの細胞のいずれにおいても感染性のあるウイルス粒子が放出されていないことが確認された。

#### [実施例6] ラット脳室へのベクターの投与

ラット(F334/Du Crj, 6週令、雌、Charles River)に生理食塩水(大塚製薬)で10倍希釈した(5 mg/ml)ネンブータルナトリウム溶液(ダイナボット)を腹腔内注射により麻酔し、小動物用脳定位固定装置(DAVID KOPF社)を用いてウイルスの投与を行った。投与部位はinteraural lineよりブレグマ(bregma)へ5.2mm、ラムダより右耳へ2.0mm、脳表面より2.4mmの位置に30Gの交換針(Hamilton社)で20 $\mu$ l (10<sup>8</sup> CIU) 注入した。すると脳室の上皮細胞にGFPの高い発現が観察された(図17)。さらに、F欠失型SeVベクターでは注射部位の周辺のウイルスが接触しうる上皮細胞または神経細胞にしかGFPタンパク質の発現が観察されず、これらの部位に病変所見が観察されなかった。投与されたラットでは解剖されるまでに外見的な行動異常や体重変化などが観察されず、解剖後各臓器、脳のほか、肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓、胃、腸等の組織器官のいずれにおいても病変所見が観察されなかった。

#### [実施例7] F欠損SeVゲノムからのF-lessウイルス粒子の形成

## &lt;1&gt;

F非発現LLC-MK2細胞およびF発現LLC-MK2細胞(LC-MK2/F7)にF欠損SeVウイルスを感染し、トリプシン存在下(+)と非存在下(-)で培養して3日後の細胞培養上清のHA assayの結果を示した(図18A)。これらの培養上清をそれぞれ発育鶏卵に接種し、2日培養後の鶏卵の漿尿液のHA assayの結果を示した(図18B)。パネル上部の「C」は対照群として用いたPBSを表わす。Dilution (希釈)の数字はウイルス液の希釈倍率を表わす。さらに、発育鶏卵でHA陽性であった漿尿液(lane 11および lane 12)を発育鶏卵に再接種して培養2日後の漿尿液のHA assayを行った(図19C)。この結果、F欠損SeVウイルスを感染したF非発現細胞または発育鶏卵ではHAが陽性にもかかわらず、発育鶏卵に再接種してもウイルスが全く増幅されず、このHA陽性のウイルス液が二次感染性がないものと判明した。

## &lt;2&gt;

F非発現細胞で増幅された非感染性ウイルス液にウイルス粒子が存在するかについて検討した。F発現細胞の培養上清、HA陽性で非感染性漿尿液、および野生型SeVからQIAamp viral RNA mini kit(QIAGEN)により調製したtotal RNAをF遺伝子とHN遺伝子をプローブとして用いてノーザンブロッティングを行った。その結果、漿尿液、またはF発現細胞の培養上清のウイルス由来のRNAのいずれもHN遺伝子のプローブでバンドが検出されたが、F遺伝子のプローブでバンドが検出されなかった(図10)。このHA陽性で感染性がない液にはF欠損ゲノムを持っている非感染性のウイルス様粒子が存在することが判明した。さらに、このHA陽性で感染性がないウイルス液を免疫電顕で調べたところ、ウイルス粒子が確認され、ビリオンのエンベロープは金コロイド標識したHN蛋白を認識する抗体では反応したが、金コロイド標識したF蛋白を認識する抗体では反応しなかった(図20)。このことはF-lessのビリオンの存在を示し、F蛋白がなくてもHN蛋白単独でウイルスがビリオンとして形成されることが判明した。F単独でSeVビリオンが形成できることはすでに報告されおり (Leyer, S. et al., J Gen. Virol 79, 683-687 (1998))

)、今回の結果はHN蛋白単独にSeVビリオンを形成できることが初めて明らかとなった。このようなF-lessビリオンを発育鶏卵で一過的に大量調製できることは、SeV F欠損RNPを包むビリオンを大量に生産ができることを示している。

### <3>

前述したように発育鶏卵で一過的に増幅されたF-lessウイルスビリオンはセンダイウイルスが感染可能な細胞にはまったく感染性を示さない。そこで機能的なRNP構造はエンベロープに包まれていることを確認するために、カチオニックリボソーム(DOSPER,Boehringer mannheim)と混合して、室温で15分間インキュベーションしてF発現細胞と非発現細胞にトランスフェクションした。その結果、カチオニックリボソームと混合しない場合は全くGFP発現細胞が観察されなかったのに対し、カチオニックリボソームと混合した場合はGFPの発現がいずれの細胞においても観察された。F非発現細胞ではGFPは単細胞で発現し、隣細胞に広がらないのに対し、F発現細胞ではGFP発現細胞は広がって、コロニーが形成されることが観察された(図21)。このことから、発育鶏卵で一過的に増幅された感染性のないビリオンはトランスフェクションなどの方法を用いて細胞に導入すれば、遺伝子を発現しうることが明らかとなった。

### 【実施例8】 FHN欠損SeVゲノムからウイルスの再構築および増幅

#### <FHN欠損ゲノムcDNAの構築>

FHN欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN) の構築はまずpUC18/KSをEcoRIで消化してpUC18/Ecoを構築し、F遺伝子の開始コドンからHN遺伝子の終止コドンまでの間の全配列を(4866-8419)を欠失させ、BsiwI部位(cgtacg)で連結し構築した。FHN欠損部位の配列をシーケンスで確認した後、EcoRIフラグメント(4057bp)をゲルから回収してpUC18/KSのEcoRIフラグメントと置き換えて構築した。このFHN欠損領域を含むKpnI/SphIフラグメント(14673bp)をゲル回収してpSeV18<sup>+</sup>のKpnI/SphIフラグメントと置き換え、プラスミドpSeV18<sup>+</sup>/ΔFHNが得られた。

一方、GFPを導入したFHN欠損SeV cDNAの構築は次のように行った。pSeV18<sup>+</sup>/Δ

FHN からSall/XhoIフラグメント(7842bp)を回収してpGEM11Z(Promega)にクロニングし、プラスミドpGEM11Z/SXdFHNとした。FHN欠失部位にd2EGFP (Clontech)のATG-TAA (846 bp)の両端にBsiwI部位を付加したPCR産物をBsiwI酵素で消化して、pGEM11Z/SXdFHNのFHN欠損部位のBsiwI部位に連結した。得られたプラスミドはpSeV18'/ $\Delta$ FHN-d2GFPとした。

#### <FHN欠損蛋白共発現細胞の作成>

F遺伝子を発現するプラスミドは前述したF欠損蛋白発現細胞株の作製に用いたものと同じのもので、HN遺伝子を発現するプラスミドはそれと同様な方法で構築し、HNのORFを含むフラグメントをpCALNdLw (Araiら, 前記)のユニークなSwaI部位に挿入し、プラスミドpCALNdLw/HNとした。

LLC-MK2細胞にpCALNdLw/FとpCALNdLw/HNを同量または異なる量比で混合し、mammalian transfection kit (Stratagene)を用いそのプロトコールに従って遺伝子導入を行った。G418で3週間選択した後クロニングした。得られた薬剤耐性クローンはそれぞれCre DNA レコンビナーゼを発現する組換えアデノウイルス(Ade/Cre) (斉藤ら, 前記)で感染し(moi=10)、FとHN蛋白質の誘導発現3日後細胞をPBS(-)で3回洗浄して回収し、ウェスタンブロッティング法を用いて抗SeV Fと抗SeV HN蛋白質のモノクローナルIgGにより検出した(図22)。

#### <pGEM/FHNの構築>

pCALNdLw/FとpCALNdLw/HNを構築に用いたFとHNフラグメントをそれぞれpGEM4Z、pGEM3Z (Promega社)にクロニングし、pGEM4Z/FとpGEM3Z/HNを得た。pGEM3Z/HNのT7プロモーターとHNを含む領域をPvuII酵素で消化して得られたフラグメントを回収し、pGEM4Z/FのF遺伝子下流のSacIユニークサイトで切断し平端化した部位にライゲーションした。F遺伝子とHN遺伝子を同一方向に並べたものは、抗Fまたは抗HNモノクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行い、FとHN両方の蛋白質は同時に発現できることを確認した。

#### <FHN欠損ウイルスの再構築>

FHN欠損ウイルスの再構築 (P0) は二通りに行った。一つはF欠損ウイルスの再構築と同様にRNPトランスフェクション法を用いた。もう一つはT7でFHN蛋白を共発現プラスミドを供給して再構築を行った。すなわち、T7プロモーターの制御下でF, HNタンパク質を発現するプラスミドを別途作製して、これによりFおよびHNタンパク質を供給して再構築を行った。いずれの方法においても再構築したものはFHN共発現細胞で増幅を行った。FHN欠損GFP発現SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup>/ΔFHN-d2GFP), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/FHNをそれぞれ、12μg/10cm dish, 4μg/10cm dish, 2μg/10cm dish, 4μg/10cm dish, 4μg/10cm dishの量比で混合し (最終容量, 3ml/10cm dish)、前述したF欠損SeVの再構築と同様な方法でLLC-MK2細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入3時間後培地をAraC(40μg/ml, SIGMA), トリプシン(7.5μg/ml, GIBCO)入りのMEMに交換し、さらに3日間培養した。遺伝子導入後2日目で蛍光実体顕微鏡で観察し、pGEM/FHNの添加の有無の違いを検証し、GFP発現細胞の広がり度でウイルスの形成を確認した。その結果、再構築時にpGEM/FHNを添加した場合はGFP発現細胞の広がりが確認され、pGEM/FHNの添加がない場合はGFP発現はシングル細胞でしか観察されなかった (図23)。FHN蛋白再構築時に添加することでウイルスのビリオンが形成されたことを示した。一方、RNPトランスフェクションの場合はF欠損と同様にP1のFHN発現細胞でウイルスの回収に成功した (図24上)。

Ade/Creを感染して6時間以後にFHN蛋白が誘導発現された細胞にFHN欠損ウイルス液を感染し増幅ができたことを確認した (図24下)。

FHN欠損GFPを発現するcDNAから再構築されたウイルス液はLLC-MK2, LLC-MK2/F, LLC-MK2/HN, LLC-MK2/FHNに感染してトリプシンの添加の有無で培養した。培養3日後にGFP蛋白発現細胞の広がりを確認したところ、LLC-MK2/FHNでのみGFPの広がりが観察され、このウイルス液はFHN共発現に特異的かつトリプシン依存的に増幅されることが確認された (図25)。

FHN欠損ウイルスゲノムを確認するため、LLC-MK2/FHN細胞から回収された培養

上清を遠心した後、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN)でそのプロトコールに従ってRNA抽出を行った。このRNAをSuperscript Preamplification System for first Strand Synthesis (GIBCO BRL)によりRT-PCRのテンプレート合成を行い、TAKARA Z-Taq(宝酒造)を用いてPCRを行った。対照群はF欠損ウイルスを用いた。PCRプライマーはM遺伝子とGFP遺伝子の組み合わせ、またはM遺伝子とL遺伝子の組み合わせを用いて行った(M遺伝子とGFP遺伝子の組み合わせ(M-GFP)については forward: 5'-atcagagacctgcgacaatgc/配列番号: 13, reverse: 5'-aagtcgtgctgcttcatgtgg/配列番号: 14; M遺伝子とL遺伝子の組み合わせ(M-L)については forward: 5'-gaaaaacttagggataaagtccc/配列番号: 15, reverse: 5'-gttatctccgggatggtgc/配列番号: 16)。その結果、MとGFP遺伝子をプライマーに用いた場合はRT条件下でF欠損とFHNとも欠損ウイルス共に特異的なバンドが検出された。MとL遺伝子をプライマーに用いた場合は、FHN欠損はGFPを含んだ所定のサイズのバンドが検出され、F欠損の場合はHN遺伝子を含んだサイズで長くなったバンドが観察された。ゲノム構造はFHN欠損していることは明らかとなった(図26)。

一方、FHN欠損ウイルスをF発現細胞にF欠損と同様に感染して、培養して4日目培養上清を回収し、LLC-MK2, LLC-MK2/F, LLC-MK2/FHNへの感染実験を行った。その結果、いずれの感染細胞においてもGFP発現細胞が観察されず、これらの細胞への感染性がないことを示した。しかし、F蛋白単独でウイルス粒子を形成できることがすでに報告され(Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996))、肝臓にあるアジアロ糖蛋白リセプター(ASG-R)を介して肝細胞に特異的に感染できることが報告された(SpiegelらJ. Virol 72, 5296-5302, 1998)。従って、FHN欠損RNAゲノムを持ち、ウイルスエンベロープはF蛋白のみで形成されたビリオンがF発現細胞の培養上清に放出されうることが考えられる。そこで、FHN欠損ウイルスを感染したF発現細胞の培養上清を回収し、遠心した後上記の方法と同様にRNA抽出を行い、前述した方法と同様にRT-PCRで解析した。その結果、図27で示し

たようにFHN欠損ゲノムを含むRNAが存在することが判明した。

この他、VSV-Gとシュードタイプ化したウイルスのビリオンのウェスタンブロッティングによる解析では、F、HN蛋白が発現していないことは明らかである。FHN欠損ウイルスビリオンの生産系が確立したと言える。

さらに、F蛋白発現細胞から放出されたビリオンをカチオニックリボソーム (50  $\mu$ lのDOSPER/500  $\mu$ l/well)との混合の有無でFHN発現細胞または非発現LLC-MK2細胞に重層した。その結果、前述したF-less粒子の場合と同様、DOSPERと混合して細胞に重層した場合にはGFP発現細胞の広がりが見られるが、HN-lessのビリオンのみでは全く細胞に感染性なく、GFP発現細胞が見られなかった。FHN非発現細胞ではGFP発現細胞が見られたが、ウイルスが再形成され広がったことが認められなかった。

このようなF発現細胞から回収されるウイルス様粒子がASG-R遺伝子を持続発現する細胞株や非発現細胞株、または肝細胞に重層して感染し、Spiegelらの方法で肝臓特異的、またはASG-Rに特異的に感染するかを調べることができる。

#### [実施例9] 欠損ゲノムRNAウイルスベクターの応用性

1. 上に述べた系で増幅されたF欠損RNPはF-lessのウイルスエンベロープに包まれており、このエンベロープを化学的に修飾法などにより所望の細胞導入能を付加し、または遺伝子導入試薬や遺伝子銃のようなもので細胞に導入して (RNPトランスフェクション、または RNPインジェクション)、その組み換えRNAゲノムが導入細胞で自律的にRNA複製または蛋白を生産し続けることが可能である。
2. HNの細胞内ドメインを残し、細胞外ドメインを他のレセプターを特異的に標的できるリガンドを融合させ、キメラ蛋白を生産できる組み換え遺伝子をウイルスゲノムに組み込めば、特異性のある標的できるベクターの生産が可能となり、また、この組み換え蛋白の生産細胞でベクターを調製可能である。これらのベクターは遺伝子治療、ワクチンなどに応用可能である。
3. FHNとも欠損するSeVウイルスの再構築に成功したことから、GFP遺伝子の代わ

りにターゲッティング可能なエンベロープキメラ蛋白の遺伝子をFHN欠損部位に導入し、FHN欠損ベクターと同様な方法で再構築し、FHN発現細胞で一度増幅して、非発現細胞に感染して、ウイルスゲノムから転写されたターゲッティング可能なキメラエンベロープ蛋白のみによって形成されたビリオンを回収すれば、ターゲッティングベクターの生産が可能となる。

4. これまでに、センダイウイルスのミニゲノム、NP,P,LとF遺伝子で細胞に同時に遺伝子導入してミニゲノムを包むF蛋白単独で形成されたビリオンが報告され (Leyerら, J Gen.Virol 79, 683-687, 1998) また、マウスの白血病ウイルスをセンダイF蛋白でシュード化したベクターも報告されている (Spiegelら J. Virol 72, 5296-5302, 1998)。また、F蛋白質がトリプシンで解裂された後ASG-Rを介して肝臓細胞に特異的にターゲッティングできると報告されている (Bitzerら J.Virol.71, 5481-5486, 1997)。前の報告の系は一過的な粒子形成系であり、持続的にベクターの粒子回収が困難である。またSpiegelらはセンダイF蛋白でシュードタイプ化したレトロウイルスベクターを報告しているが、レトロウイルスは分裂細胞にしか遺伝子導入できないなどの固有の問題を抱えている。本発明で回収された、FHN共欠損SeVウイルスゲノムを持ち、F蛋白のみエンベロープ蛋白を持つウイルス粒子等は、細胞分裂に関係なく効率的な細胞質で自律複製可能なRNAベクターであり、新規のウイルス粒子であり、またその大量生産が可能な実用的な系である。

#### [実施例 10] FHN欠損SeVゲノムからウイルスの再構築および増幅

センダイウイルス、麻疹ウイルス等の多くの一本鎖マイナス鎖RNAウイルスで、ウイルスゲノムをクローニングしたcDNAから感染可能なウイルス粒子を再構成する技術が確立された。

ほとんどの系で、T7プロモーター下流にcDNA、NP,P,L遺伝子を導入したプラスミドを細胞内に導入し、T7ポリメラーゼを用いてcDNA、各遺伝子を発現させることにより再構成を行っているが、T7ポリメラーゼの供給には、T7ポリメラーゼ発

現組み換えワクシニアウイルスが主に使われている。

T7発現ワクシニアウイルスは、ほぼすべての細胞に効率よくT7ポリメラーゼを発現させることができるが、ワクシニアウイルス由来の細胞障害性のために、感染細胞を2、3日しか生存させることができない。多くの場合、抗ワクシニア薬剤としてリファンピシンを用いているが、加藤らの系 (Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) では、リファンピシンのほかに、AraCを並行して用いることにより、ワクシニアウイルスの増殖を最小限に抑え、センダイウイルスの再構成を効率よく行うことに成功した。

しかしながら、センダイウイルスを始めとするマイナス鎖RNAウイルスの再構成は $1 \times 10^6$ 細胞中に再構成されたウイルスが数粒子かそれ以下という効率で、レトロウイルス等のほかのウイルスに比べるといまだにかなり低いのが実情である。この理由として、ウイルス自体が持つ、再構成までの複雑な過程（裸のRNAに別途転写、翻訳されたタンパク質がついてRNP様構造となり、その後、ポリメラーゼにより転写、複製が行われる）とともに、ワクシニアウイルスを用いることによる細胞障害性も挙げられる。

T7ポリメラーゼを供給する手段として、ワクシニア以外にアデノウイルスの系も試みたが、よい結果は得られなかった。ワクシニアウイルスはT7ポリメラーゼのほかに細胞質で働くRNAキャッピング酵素も自身の蛋白としてコードしており、この酵素が、細胞質でT7プロモーターにより転写されたRNAをキャッピングして安定化することにより翻訳効率を高めていると考えられる。本発明では、ワクシニアウイルスをPsoralen-Long-Wave-UV法で処理することにより、ワクシニアウイルスに由来する細胞障害を回避し、センダイウイルスの再構成効率を高めることを試みた。

ソラレンと長波長紫外線によるDNAクロスリンキングにより、DNAをゲノムに持つウイルスの複製を阻害し、しかし特に初期遺伝子の発現には影響を与えない状態を作り出すことが可能である。ワクシニアウイルスはゲノム長が長いので、こ

の系によるウイルスの不活化の影響が顕著にあらわれると考えられる (Tsung, K. et al., J Virol 70,165-171 (1996))。

自立増殖可能な野生型ウイルスの場合、再構成により一粒子でもウイルスができていればトランスフェクションした細胞を発育鶏卵に接種してセンダイウイルスを増殖させることが可能なため、再構成の効率、そしてワクシニアウイルスの残留にそれほど気を使わなくてもよい。

しかし、ウイルスの複製、粒子形成の機構などを調べるために作る様々な変異ウイルスの再構成では、増殖に発育鶏卵を使用できずにウイルス由来のタンパク質を発現している細胞株などを用いざるを得ない場合もありうる。また、変異ウイルスまたは欠損ウイルスが野生型ウイルスに比べて顕著に増殖が遅いケースも、十分考えられる。

こうした変異を持つセンダイウイルスを増殖させるためには、トランスフェクション後の細胞を次代の細胞に重層して長時間培養しなければならない。そのために、再構成の効率とワクシニアウイルスの残存タイターが問題になってくる。本方法では、再構成効率を上昇させるとともに、残存ワクシニアウイルスのタイターを減少させることもできた。

本方法を用いて、現在までの、未処理のワクシニアウイルスを用いた系では得られなかった変異ウイルスを再構成によりうることができた(F、F H N 欠損ウイルス)。この系は、今後増えるであろう変異ウイルスの再構成に大きなツールとなると考える。そこで本発明者らは、ソラーレンと紫外線 (UV) の量を検討し、ワクシニアウイルスの不活化の条件を検討した。

#### <実験>

まず、照射時間を二分間に定め、ソラレン濃度の検定を行った。不活化の検定は、プラーク形成によるワクシニアウイルスのタイターの測定と、T7プロモーター支配下pGEM-luciプラスミド、センダイウイルスミニゲノムによるT7ポリメラーゼ活性の測定によって行った。センダイウイルスミニゲノムによるT7ポリメラー

ゼ活性の測定はセンダイウイルスミニゲノムのプラスミドと、T7でセンダイウイルスNP、P、L蛋白を発現するpGEM/NP, pGEM/P, pGEM/Lプラスミドと同時に細胞にトランスフェクションし、リボヌクレオ蛋白複合体を形成させ、センダイウイルスのRNAポリメラーゼによりルシフェラーゼ酵素蛋白の転写を調べる系である。

UV照射二分間では、ソラレンの濃度に応じてワクシニアウイルスのタイターの減少が見られた。しかし、T7ポリメラーゼ活性は、ソラレン濃度が0、0.3、1  $\mu$ g/ml迄は変化を見せず、10  $\mu$ g/mlでは10分の1程度に減少していた。(図28)

さらに、ソラレン濃度を0.3  $\mu$ g/mlに固定し、紫外線照射時間を検討した。照射時間が増大するに連れ、ワクシニアウイルスのタイターは減少したが、30分までの照射ではT7ポリメラーゼ活性への影響は見られなかった。このとき、0.3  $\mu$ g/ml、30分照射の条件では、T7ポリメラーゼ活性に影響を与えず、タイターを1000分の1にまで減少させることができた。(図29)

しかしながら、タイターが1000分の1にまで減少したワクシニアウイルスでも処理前のタイターに換算してmoi=2 (処理後の残存タイターでmoi=0.002) で感染したときの24時間後のCPEは、未処理のウイルスをmoi=2で感染させたときのそれと変わらなかった(図30)。

この条件で処理したワクシニアウイルスを用い、センダイウイルス再構成の効率を検討した。再構成は、前記加藤らの方法をモディファイし、以下の手順で行った。6wellのマイクロプレートにLLC-MK2細胞を $3 \times 10^5$ 細胞/wellで撒き、終夜培養した後、PLWUV処理前のタイター換算で $6 \times 10^5$  pfu/100  $\mu$ lとなるようにワクシニアウイルスを希釈し、PBS洗浄後の細胞に感染させた。1時間の感染後、100  $\mu$ lのOPTI-MEMにプラスミド、pGEM-NP, P, L、そしてcDNAをそれぞれ1, 0.5, 1, 4  $\mu$ gを加えたものに、Superfect (QIAGEN) を10  $\mu$ l加え、室温で15分放置した後1mlのOPTI-MEM (GIBCO) (Rif. AraCを含む) をくわえ、細胞に重層した。

トランスフェクション後2、3、4日目に細胞を回収し、遠心後、300  $\mu$ l/well

のPBSに懸濁した。この懸濁液を原液、あるいは10倍、100倍希釈した細胞溶液100  $\mu$ lを受精後10日目の発育鶏卵に各希釈4個ずつ接種した( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ 細胞をそれぞれ接種)。3日後鶏卵から尿液を回収しHA試験によりウイルス再構成の有無を調べた(表1)。 $1 \times 10^5$ 細胞を接種した鶏卵のうち、HA活性があった鶏卵を一点、 $10^4$ では十点、 $10^3$ では百点と数えて、再構成の効率(Reconstitute Score)を求めた(図31)。計算式は表1の通り。

表1 ワクシニアウイルスのUV処理時間のセンダイウイルス再構成効率に対する影響

接種細胞数	スコアー (a)	HA陽性卵数 (b)											
		2d						3d					
		0'	15'	20'	30'	0'	15'	20'	30'	0'	15'	20'	30'
$10^5$	1 (a1)	1	2	4	4	0	0	2	4	4	1	3	4
$10^4$	10 (a2)	0	1	3	2	0	0	2	3	4	0	0	0
$10^3$	100 (a3)	0	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0
Reconsti- tution Score	(a1+a2+a3) x b	1	12	24	124	0	122	34	244	1	3	44	4

$$\text{Reconstitution Score} = (a1+a2+a3) \times b$$

また、トランスフェクション後2、3、4日での、細胞に残存するワクシニアウイルスのタイターを測ったところ、トランスフェクション前に与えたタイターに比例して、処理をしたものが少なくなっていた(図32)。

ワクシニアウイルスをPLWUVで不活化することにより、T7ポリメラーゼ活性には影響を与えず、タイターを1000分の1にまで下げることができた。しかし、ワクシニアウイルス由来のCPEは、顕微鏡観察で未処理の、1000倍のタイターを持つウイルスのそれと変わらなかった。

この条件で処理をしたワクシニアウイルスを、センダイウイルス再構成に用いることにより、センダイウイルスの再構成効率が、数十倍から百倍ほど増大した(図31)。同時に、トランスフェクション後に残ったワクシニアウイルスのタイターは、5pfu/10<sup>5</sup> cells以上ではなかった。従って、複製可能なワクシニアウイルスの残留は0.005%以下に抑えられた。

#### [実施例11] シュードタイプセンダイウイルスの作製

##### <1> VSV-G 遺伝子産物を誘導発現するヘルパー細胞の作製

VSV-G 遺伝子産物は細胞障害性を有しているため、Cre リコンビナーゼにより VSV-G 遺伝子産物が誘導発現されるよう設計されたプラスミド pCALNdLG(Arai T. ら J.Virology 72 (1998) p1115-1121) を用い、LLC-MK2 細胞での安定導入株の作出を行った。LLC-MK2 細胞へのプラスミドの導入は、リン酸カルシウム法 (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit、クローンテック社製) により、添付マニュアルに従って行った。

10 cm プレートを用い、60%コンフルエントまで生育した LLC-MK2 細胞に10  $\mu$ gのプラスミド pCALNdLG を導入後、10 ml の MEM-FCS10% 培地にて、37°Cの 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で24時間培養した。24時間後に細胞を剥がし、10 mlの培地に懸濁後、10 cm シャーレ5枚を用い 5 ml 1枚、2 ml 2枚、0.5 ml 2枚に撚き、G418(GIBCO-BRL社製) 1200  $\mu$ g/mlを含む10 ml の MEM-FCS10%培地で培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を

行った。該培養により生育してきたG418に耐性を示す細胞は、クローニングリングを用いて28株を回収した。各クローンは10 cm プレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続けた。

各クローンについて、Cre リコンビナーゼを含む組み換えアデノウイルス AxCANCreを感染後、抗 VSV-G モノクローナル抗体を用いて、VSV-G の発現を以下に記載のウェスタンブロット法により調べた。

各クローンは6 cm シャーレにて、コンフルエントまで生育させた後、アデノウイルス AxCANCre を齋藤らの方法（上記）により MOI=10で感染後、3日間培養した。該細胞は培養上清を取り除いた後、PBS緩衝液で洗浄し、0.05% トリプシン、0.02% EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液 0.5 mlを加え、37℃、5分間インキュベートすることによりシャーレより剥がした。該細胞は3 ml PBS緩衝液に懸濁後、1,500 x gで5分間遠心し、細胞を集めた。得られた細胞はさらに2ml PBS緩衝液に再度懸濁後、1,500 x gで5分間遠心分離することにより、細胞を集めた。

該細胞は-20℃で保存することが可能で、必要に応じて解凍して使用することができる。集めた細胞は100  $\mu$ L の細胞溶解液（RIPA バッファー、ベーリンガーマンハイム社製）により溶解し、該細胞の全蛋白質（1レーン当たり  $1 \times 10^5$  細胞）を用いてウェスタンブロットを行った。細胞溶解液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルバッファー〔6mM トリス-塩酸 (pH6.8)、2% SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液〕に溶解し、95℃5分加熱後電気泳動用試料に供した。該試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル（マルチゲル 10/20、第一化学社製）を用い、電気泳動により分画し、分画された蛋白質をセミドライブロット法により転写膜（Immobilon-P TransferMembranes、Millipore 社製）に転写した。転写は、100% メタノールに20秒、水に一時間浸した転写膜を使用し、1 mA/cm<sup>2</sup> 定電流の条件で1時間行った。

該転写膜を、40 ml のブロッキング溶液（ブロックエース、雪印社製）中で1時間振盪させた後、PBS緩衝液で一度洗浄した。

該転写膜および10%ブロッキング溶液を含むPBS緩衝液で1/1000に希釈した抗VSV-G抗体（クローンP4D4、シグマ社製）5 mlをビニールバッグに入れてシールし、4℃で静置させた。

該転写膜を2度40 mlのPBS-0.1%Tween 20に5分間浸漬し、洗浄した後、PBS緩衝液で5分間浸漬し、洗浄した。

該転写膜および10%ブロッキング溶液を含むPBS緩衝液で1/2500に希釈したパーオキシダーゼで標識された抗マウスIgG抗体（anti-mouseimmunoglobulin, Amersham社製）5 mlをビニールバッグに入れ、シールをした後、室温で1時間振盪させた。

振盪後、該転写膜を2度PBS-0.1%Tween 20に5分間浸漬し、洗浄した後、PBS緩衝液に5分間浸漬し、洗浄した。

発光法（ECL Western blotting detection reagents, Amersham社製）により、抗VSV-G抗体と交叉の見られる該転写膜上の蛋白質の検出を行った。結果を図33に示す。3クローンで、AxCANCre感染特異的なVSV-Gの発現が検出され、VSV-G遺伝子産物を誘導発現するLLC-MK2細胞の作出が確認された。

得られた細胞株の一株をLLCG-L1と呼び、抗VSV抗体を用いてフローサイトメトリ解析を行った（図34）。その結果、LLCG-L1では、VSV-G遺伝子誘導発現時特異的に抗体との反応性が検出され、VSV-Gタンパク質が細胞表面に発現されることが確認された。

<2> ヘルパー細胞を用いたF遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウイルスの作製

F遺伝子を欠失したゲノムを有するセンダイウイルスをVSV-G遺伝子発現細胞に感染させ、VSV-Gを外被に有するシュードタイプウイルスの産生が見られるかを、上記実施例に記載のGFP遺伝子を含むF欠失型センダイウイルスを用い、GFP遺

伝子の発現を指標に調べた。その結果、Cre リコンビナーゼを含む組み換え アデノウイルス AxCANCre を感染しない LLCG-L1 では、F 欠失型 センダイウイルス の感染により ウイルス 遺伝子が導入され、GFP 発現細胞は 検出されるものの、その細胞数は 増えず、VSV-G を誘導発現させた細胞では、経時的に GFP 発現細胞の増加が認められた。その上清の 1 / 5 量をさらに、新たな VSV-G を誘導発現させた細胞に添加したところ、前者由来の上清では、遺伝子導入が全くみとめられず、後者由来の上清では遺伝子導入および GFP 発現細胞の増加が認められた。また、後者由来の上清を VSV-G を誘導しない LLCG-L1 細胞に添加した際には、遺伝子導入はされるものの、GFP 発現細胞の増加は認められなかった。以上の結果から、VSV-G 発現細胞特異的に ウイルスが 増殖することが認められ、VSV-G との シュードタイプ の F 欠失型 センダイウイルス の生成が認められた。

### <3> F 遺伝子を欠失したゲノムを有する シュードタイプ センダイウイルス の産生条件の検討

VSV-G 遺伝子の発現量の影響を調べるため、AxCANCre の感染量 (MOI=0、1、2.5、5、10) を変え、一定量の F 遺伝子を欠失したゲノムを有する シュードタイプ センダイウイルス を感染後、7 日目から 8 日目の上清を回収し、さらに VSV-G 誘導前、誘導後の細胞に感染させ、5 日目の GFP の発現している細胞の数を比較したところ、MOI=0 ではウイルスの産生が全く認められず、MOI=10 の条件で最も多いことがわかった (図 3 5)。また、経時的にウイルス産生量を調べたところ、シュードタイプ センダイウイルス 感染後 5 日目以降から産生量が上昇し、8 日目まで産生が確認できた (図 3 6)。ウイルス力価の測定は、VSV-G 誘導前の細胞に、10 倍ずつ段階的に希釈したウイルス液を添加し、感染後 5 日目の GFP の発現細胞を数えることにより、ウイルス液中の細胞への感染粒子数 (CIU) を求めた。その結果、最高ウイルス産生量は  $5 \times 10^5$  CIU/ml であった。

### <4> F 遺伝子を欠失したゲノムを有する シュードタイプ センダイウイルス の抗 VSV 抗体による感染性の影響

VSV-G 発現株を用いて得られたF 遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウイルスが、外被にVSV-G タンパク質を有するかに関して、抗VSV 抗体を用いて感染性の影響されるかどうかの中和活性を調べた。ウイルス液と抗体を混合し、室温で30分静置後、VSV-G を誘導発現していないLLCG-L1 細胞に感染し、5日目の遺伝子導入能をGFP発現細胞の有無で調べた。その結果、抗VSV 抗体で感染性の完全な抑制が認められ、本来の外被を有するF 遺伝子を欠失したゲノムを有するセンダイウイルスでは抑制が認められなかった(図37)。このことから、今回得られたウイルスが、外被にVSV-G タンパク質を有するシュードタイプのセンダイウイルスであり、抗体によりその感染性が特異的に抑えられることが明らかとなった。

<5> シュードタイプセンダイウイルスが F 欠失型ゲノムを有することの確認  
今回VSV-G 遺伝子発現細胞で増殖したウイルスが F 欠失型であることを、感染細胞抽出液のタンパク質のウェスタン解析により調べた。ウェスタン解析は、上記に記載の方法により行った。一次抗体として、ウサギより調製された、抗センダイウイルスポリクローナル抗体、マウスより調製された抗Fタンパク質モノクローナル抗体、マウスより調製された抗HNタンパク質モノクローナル抗体を用い、2次抗体に、抗センダイウイルスポリクローナル抗体の場合はパーオキシダーゼで標識された抗ウサギIgG抗体、抗Fタンパク質モノクローナル抗体、抗HNタンパク質モノクローナル抗体の場合はパーオキシダーゼで標識された抗マウスIgG抗体を用いた。その結果、センダイウイルス由来のタンパク質およびHNタンパク質は検出されるものの、Fタンパク質は検出されなかったことから、F欠失型であることが確認された。

<6> ヘルパー細胞を用いたFおよびHN 遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウイルスの作製

FおよびHN 遺伝子を欠失したゲノムを有するセンダイウイルスを VSV-G遺伝子発現細胞LLCG-L1に感染させ、VSV-Gを外被に有するシュードタイプウイルスの

産生が見られるかを、上記実施例に記載のGFP遺伝子を含むF、HN欠失型センダイウイルスを用い、上記実施例と同様の方法でGFP遺伝子の発現を指標に調べた。その結果、VSV-G発現細胞特異的にウイルスが増殖することが認められ、VSV-GとのシュードタイプのF、HN欠失型センダイウイルスの生成が認められた(図38)。ウイルス力価の測定は、VSV-G誘導前の細胞に、10倍ずつ段階的に希釈したウイルス液を添加し、感染後5日目のGFPの発現細胞を数えることにより、ウイルス液中の細胞への感染粒子数(CIU)を求めた。その結果、最高ウイルス産生量は $1 \times 10^6$  CIU/mlであった。

。<7> シュードタイプセンダイウイルスがFおよびHN欠失型ゲノムを有することの確認

今回VSV-G遺伝子発現細胞で増殖したウイルスがFおよびHN欠失型であることを、感染細胞抽出液のタンパク質のウェスタン解析により調べた。その結果、センダイウイルス由来のタンパク質は検出されるものの、FおよびHNタンパク質は検出されなかったことから、FおよびHN欠失型であることが確認された(図39)。

#### [実施例12] ウイルス再構成法の検討

##### <従来法>

LLC-MK2細胞を $5 \times 10^6$  cells/dishで100mmペトリ皿に蒔き、24時間培養後、血清を含まないMEM培地で1回洗浄した後、3 $\mu$ g/mlのソラレンと長波長紫外線(365nm)で5分間処理したT7RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(Fuerst, T.R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 8122-8126 1986)(vTF7-3)に室温で1時間感染させた(moi=2)(moi=2~3、好適にはmoi=2が用いられる)。細胞を、血清を含まないMEM培地で2回洗浄した後、プラスミドpSeV18'/ $\Delta$ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/L(Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579(1996))をそれぞれ12 $\mu$ g, 4 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 及び4 $\mu$ g/dish

の量比で Opti-MEM培地(GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1  $\mu$ g DNA/5  $\mu$ l のSuperFect, QIAGEN)を入れ、室温で 15 分間放置後、最終的に 3% FBSを含む Opti-MEM培地 3 ml に入れた DNA-SuperFect 混合物を細胞に添加して培養した。3時間培養後、細胞を、血清を含まないMEM培地で 2 回洗浄し、シトシン  $\beta$ -D-アラビノフラノシド 40  $\mu$ g/ml (AraC, Sigma)を含むMEM培地で 70 時間培養した。これらの細胞と上清を回収し、それぞれ P0-d3 サンプルとした。P0-d3 のペレットを Opti-MEM培地に懸濁した ( $10^7$  cells/ml)。凍結融解を 3 回繰り返して lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim)と混合し( $10^6$  cells/25  $\mu$ l DOSPER)室温で 15 分間放置した後、F発現 LLC-MK2/F7 細胞株にトランスフェクション( $10^6$  cells/well 24-well-plate)し、血清を含まないMEM培地 (40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/m トリブシンを含む)で培養した。培養後 3 日目および 7 日目に上清を回収し、それぞれ P1-d3 および P1-d7サンプルとした。

#### <エンベローププラスミド+F発現細胞重層法>

プラスミドにエンベローププラスミド pGEM/FHN を4  $\mu$ g/dish加えた以外は、上記と同様の操作を行い、トランスフェクションを行った。3 時間培養後、細胞を、血清を含まない MEM培地で 2 回洗浄し、シトシン  $\beta$ -D-アラビノフラノシド 40  $\mu$ g/ml (AraC, Sigma) とトリブシン 7.5  $\mu$ g/ml を含むMEM培地 で 48 時間培養した。培養上清を取り除き、血清を含まない MEM培地(40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/m トリブシンを含む)に懸濁された100 mm ペトリ皿 1 枚分の F 発現 LLC-MK2/F7 細胞懸濁液 5 ml を重層した。培養48時間後、これらの細胞と上清を回収し、それぞれ P0-d4 サンプルとした。P0-d4 のペレットを Opti-MEM培地 に懸濁し ( $2 \times 10^7$  cells/ml)、凍結融解を 3 回繰り返して F 発現 LLC-MK2/F7 細胞株に重層( $2 \times 10^6$  cells/well 24-well-plate)し、血清を含まないMEM培地(40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/m トリブシンを含む)で培養した。培養後 3 日目および 7 日目に上清を回収し、それぞれ P1-d3 および P1-d7サンプルとした。比較のため、重層を行わず、エンベローププラスミドのみを添加し、上記の従来法と全く同じ方法でも実験を

行った。

<GFP発現細胞のカウントによるCIUの測定(GFP-CIU)>

LLC-MK2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で 12well-plate に蒔き、24 時間培養後、血清を含まない MEM 培地で 1 回洗浄した後、上記のサンプル(P0-d3 または P0-d4、P1-d3 および P1-d7)を、陽性細胞が  $10\text{cm}^2$  中に 10~100 個の間の数になるように適宜希釈し、 $100\mu\text{l/well}$  で感染させた。15 分後血清を含まない MEM 培地を  $1\text{ml/well}$  加えた。さらに 24 時間培養後、細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP 発現細胞のカウントを行った。

<CIU(Cell-Infected Unit)測定>

LLC-MK2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/dish で 12well-plate に蒔き、24 時間培養後、血清を含まない MEM 培地で 1 回洗浄した後、上記サンプル (含まれるウイルスベクターを SeV/ $\Delta$ F-GFP と称す) を  $100\mu\text{l/well}$  で感染した。15 分後、血清を含まない MEM 培地を  $1\text{ml/well}$  加え、さらに 24 時間培養した。培養後、PBS(-) で 3 回洗浄した後、細胞を乾燥させ (約 10 分~15 分室温放置)、細胞を固定するため、アセトンを  $1\text{ml/well}$  加え直ちに除去し、再び乾燥させた (約 10 分~15 分室温放置)。PBS(-) で 100 倍希釈したウサギより調製された抗 SeV ポリクローナル抗体 (DN-1) を  $300\mu\text{l/well}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間インキュベートした後、PBS(-) で 3 回洗浄し、PBS(-) で 200 倍希釈した抗ウサギ IgG(H+L) 蛍光標識二次抗体 (AlexaTM568: Molecular Probes 社製) を  $300\mu\text{l/well}$  加え、 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間インキュベートした。PBS(-) で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡下 (Emission:  $560\text{nm}$ , Absorption:  $645\text{nm}$  フィルター: ライカ社製) で蛍光を発する細胞を観察した (図 40)。

対照として上記サンプル (SeV/ $\Delta$ F-GFP) を  $100\mu\text{l/well}$  で感染し 15 分後、血清を含まない MEM を  $1\text{ml/well}$  加え、さらに 24 時間培養後、以後の操作を行わずに細胞を蛍光顕微鏡下 (Emission:  $360\text{nm}$ , Absorption:  $470\text{nm}$  フィルター: ライカ社製) で GFP 発現細胞を観察した。

【実施例 13】 欠失型センダイウイルスベクターの再構成効率向上のための最適なワクシニアウイルス(vTF7-3)のPLWUV(Psoralen and Long-Wave UV Light)処理条件検討

LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish で 100 mm ペトリ皿に蒔き、24 時間培養後、血清を含まない MEM 培地で 1 回洗浄した後、 $0.3 \sim 3 \mu\text{g/ml}$  のソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 2~20 分間処理した T7 RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(vTF7-3) (Fuerst, T.R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 8122-8126(1986)に室温で 1 時間感染させた (moi=2) (moi=2~3、好適には moi=2 が用いられる)。細胞を血清を含まない、MEM 培地で 2 回洗浄した後、プラスミド pSeV18<sup>+</sup>/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及び pGEM/L(Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579(1996)), をそれぞれ  $12 \mu\text{g}$ ,  $4 \mu\text{g}$ ,  $2 \mu\text{g}$ , 及び  $4 \mu\text{g/dish}$  の量比で Opti-MEM 培地(GIBCO)に懸濁し、SuperFect transfection reagent ( $1 \mu\text{g DNA}/5 \mu\text{l}$  の SuperFect, QIAGEN)を入れ、室温で 15 分間放置後、最終的に 3%FBSを含む Opti-MEM 培地 3 ml に入れた DNA-SuperFect 混合物を細胞に添加して培養した。3 時間培養後、細胞を、血清を含まない、MEM 培地で 2 回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド  $40 \mu\text{g/ml}$  (AraC, Sigma) を含む MEM 培地で 48 時間培養した。100 mm ペトリ皿の約 1/20 視野の細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP 発現細胞のカウントした。ワクシニアウイルス(vTF7-3)の不活化の検定にはブランク形成によるタイターの測定(永井美之ら, ウイルス実験プロトコール, p291-296, 1995)を行った。

さらに、トランスフェクション後の回収時期を3日目に着目し、ソラレンとUV 照射時間の検討を行った。各PLWUV処理を行ったワクシニアウイルス(vTF7-3)を用い、センダイウイルス再構成の効率を検討した。再構成は加藤らの方法(上記)を改変し、以下の手順で行った。6 wellのマイクロプレートに LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^5$  細胞/wellで撒き、終夜培養した後 ( $1 \times 10^6$  細胞/wellに増殖していると仮定)、PLWUV処理前のタイター換算で  $2 \times 10^6$  pfu/100  $\mu\text{l}$  となるようにワクシニ

アウイルス(vTF7-3)を希釈し、PBS洗浄後の細胞に感染させた。1時間の感染後、50  $\mu$ l の Opti-MEM培地(GIBCO)にプラスミド、pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/L、そして付加型SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup> b(+)) (Hasan, M. K. et al., J. General Virology 78: 2813-2820, 1997) をそれぞれ 1, 0.5, 1, 4  $\mu$ gを加えたものに、SuperFect(QIAGEN)を 10  $\mu$ l 加え、室温で15分放置した後、1 mlの Opti-MEM(40  $\mu$ g/mlの AraC を含む)を加え、細胞に重層した。トランスフェクション後、3日目に細胞を回収し、遠心後、100  $\mu$ l/wellのPBSに懸濁した。この懸濁液を10倍、100倍、1000倍希釈した細胞溶液 100  $\mu$ l を受精後 10 日目の発育鶏卵に各希釈 3 個ずつ摂取した。(1 $\times$ 10<sup>5</sup>, 1 $\times$ 10<sup>4</sup>, 1 $\times$ 10<sup>3</sup> 細胞をそれぞれ摂取)。3 日後鶏卵から尿液を回収し HA 試験によりウイルス再構成の有無を調べた。1 $\times$ 10<sup>5</sup> 細胞を摂取した鶏卵のうち、HA 活性があった鶏卵を一点、10<sup>4</sup> では十点、10<sup>3</sup> では百点と数えて、再構成の効率を求めた。

#### <結果>

実施例 1 2 および 1 3 の結果を図 4 0 ~ 4 3、および表 2 に示す。エンベロープ発現プラスミドと細胞重層の組み合わせによるSeV/ $\Delta$ F-GFPの再構成効率の向上が確認された。P0 (継代前) のd3~d4 (3日目~4日目) において、著しい改善が認められた (図 4 1)。表 2 では、トランスフェクション後 3 日目の細胞を卵に接種した。0.3  $\mu$ g/mlのソラレン濃度で 20 分間の処理が、最も再構成効率が高かった (3日目) ことから、この条件を最適条件とした (表 2)。

表2 センダイウイルス再構成に及ぼすワクシニアウイルスのPLWUV処理の影響

センダイウイルスの再構成に及ぼすワクシニアウイルスのPLWUV処理の検討  
(トランスフェクション後3日目の細胞を卵に接種)

接種細胞数	スコア (a)	HA陽性卵数(b)							
		0 μg/ml	0.3 μg/ml	1 μg/ml				3 μg/ml	
		0'	20'	5'	10'	20'	3'	5'	10'
10 <sup>5</sup>	1(a1)	0	3	3	3	3	3	3	3
10 <sup>4</sup>	10(a2)	0	3	2	3	3	1	3	1
10 <sup>3</sup>	100(a3)	0	3	0	1	1	0	1	0
Reconsti- tution Score	(a1+a2+a3)×b	0	333	43	133	133	13	133	13

Reconstitution Score = (a1+a2+a3)×b

【実施例14】 GFPを含まないLacZ搭載 F 欠失型センダイウイルスベクターの作製

#### <LacZ 遺伝子を含む F 欠失型 SeV ベクター cDNA の構築>

実施例1記載の pSeV18'/ΔF のNP 遺伝子上流域に存在する Not I 切断部位に LacZ 遺伝子を搭載した cDNA (pSeV(+18:LacZ)/ΔF) を構築するため PCR により LacZ 遺伝子の増幅を行った。LacZ 遺伝子を6の倍数 (Hausmann, S et al., RNA 2, 1033-1045 (1996)) にあわせ、5' 末側には NotI 切断部位を付与したプライマー (5'-GCGCGGCCGCCGTACGGTGGCAACCATGTCGTTTACTTTGACCAA-3' / 配列番号: 17) を、3' 末に SeV の転写終結シグナル (E)、介在配列 (I) および転写開始シグナ

ル (S) を付与し、NotI 切断部位を付与したプライマー (5'-GCGCGGCCGCGATGAACCTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGCTATTACTTCTGACACCAGACCAACTGGTA-3' / 配列番号: 18) を用い、プラスミド pCMV- $\beta$  (クローンテック社製) を鋳型としてPCR 反応を行った。反応条件は、pCMV- $\beta$  50 ng、200  $\mu$ M dNTP (ファルマシアバイオテク社製)、100 pM プライマー、Vent ポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラボ社製) 4U を添付の反応バッファーとともに混合後、94°C 30 秒、50 °C 1 分、72 °C 2 分の反応温度サイクル25回で行った。反応産物をアガロースゲル電気泳動で泳動後、3.2 キロベースの断片を切り出し、精製後、NotI で切断し、pSeV18+/ $\Delta$ F Not I 切断片とライゲーションして pSeV(+18:LacZ)/ $\Delta$ F を得た。

#### <従来法>

LLC-MK2 細胞を  $5 \times 10^6$  cells/dish で100 mm ペトリ皿に蒔き、24 時間培養後、血清を含まない MEM で 1 回洗浄した後、3  $\mu$ g/ml のソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 5 分間処理した T7 RNA ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(vTF7-3) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126(1986)) に室温で 1 時間感染させた (moi=2) (moi=2~3、好適には moi=2 が用いられる)。細胞を血清を含まない MEM で 2 回洗浄した後、LacZ 搭載 F 欠失型センダイウイルスベクター cDNA (pSeV (+18:LacZ) $\Delta$ F), pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/L(Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579(1996)), をそれぞれ 12  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g/dish およびエンベローププラスミド pGEM/FHN を4  $\mu$ g/dish加え、Opti-MEM(GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1  $\mu$ g DNA/5  $\mu$ l のSuperFect, QIAGEN)を入れ、室温で 15 分間放置後、最終的に 3% FBSを含むOpti-MEM 3 ml に入れた DNA-SuperFect 混合物を細胞に添加して培養した。3 時間培養後、細胞を、血清を含まない MEM で 2 回洗浄し、シトシン $\beta$ -D-アラビノフラノシド 40  $\mu$ g/ml (AraC, Sigma) とトリブシン 7.5  $\mu$ g/ml を含むMEMで 24 時間培養した。培養上清を取り除き、血清を含まない MEM培地(40  $\mu$

g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/ml トリブシンを含む) に懸濁された100 mm ペトリ皿 1 枚分の F 発現 LLC-MK2/F7 細胞懸濁液 5 ml を重層した。さらに培養48時間後、これらの細胞と上清を回収し、それぞれ P0-d3 サンプルとした。P0-d3 のペレットを Opti-MEM 培地 に懸濁し ( $2 \times 10^7$  cells/ml)、凍結融解を 3 回繰り返して lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) と混合し ( $10^6$  cells/25  $\mu$ l DOSPER) 室温で 15 分間放置した後、F 発現 LLC-MK2/F7 細胞株にトランスフェクション ( $10^6$  cells/well 24-well-plate) し、血清を含まない MEM 培地 (40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/ml トリブシンを含む) で培養した。培養後 7 日目に上清を回収し、P1-d7 サンプルとした。さらに上清全量を 12-well-plate に撹いた F 発現 LLC-MK2/F7 細胞株に 37 °C 1 時間感染後、MEM 培地 培地で一回洗浄した後、血清を含まない MEM 培地 (40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/ml トリブシンを含む) で培養した。培養後 7 日目に上清を回収し、P2-d7 サンプルとした。さらに上清全量を 6-well-plate に撹いた F 発現 LLC-MK2/F7 細胞株に 37 °C 1 時間感染後、MEM 培地 培地で一回洗浄した後、血清を含まない MEM 培地 (7.5  $\mu$ g/ml トリブシンを含む) で培養した。培養後 7 日目に上清を回収し、P3-d7 サンプルとした。さらに上清全量を 10 cm plate に撹いた F 発現 LLC-MK2/F7 細胞株に 37 °C 1 時間感染後、MEM 培地 培地で一回洗浄した後、血清を含まない MEM 培地 (40  $\mu$ g/ml AraC, 7.5  $\mu$ g/ml トリブシンを含む) で培養した。培養後 7 日目に上清を回収し、P4-d7 サンプルとした。

< LacZ 発現細胞のカウントによる CIU の測定 (LacZ-CIU) >

LLC-MK2 細胞を  $2.5 \times 10^6$  cells/well で 6 well-plate に蒔き、24 時間培養後、血清を含まない MEM 培地 で 1 回洗浄した後、P3-d7 の 1/10 希釈系列を MEM 培地で作製し、37 °C 1 時間感染後、MEM 培地で一回洗浄し、10% 血清を含む MEM 培地 1.5 ml を添加した。37 °C で 3 日培養後、細胞を  $\beta$ -Gal 染色キット (インビトロジェン社) により染色した。3 回の実験の結果を図 4 4 に示す。LacZ 染色陽性細胞数を数えた結果、いずれの場合でも P3-d7 サンプルにおいて  $1 \times 10^6$  CIU/ml のウイルスが得られていることがわかった。

【実施例 15】 センダイウイルスにおける極性効果を利用した遺伝子発現量の制御

<SeVゲノムcDNAの構築>

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV(+) (Kato, A. et al., Genes to Cells 1: 569-579, 1996)のcDNAに新たな *Not* I サイトを各遺伝子のスタートシグナルとATG翻訳開始シグナルの間に導入した。導入方法としてはまず、図45(A)のようにpSeV(+)を *Sph* I/*Sal* Iで消化した断片 (2645bp)、*Cla* Iで消化した断片 (3246bp)、及び *Cla* I/*Eco* RIで消化した断片 (5146bp) をそれぞれアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN社製) で回収・精製した。*Sph* I/*Sal* Iで消化した断片はLITMUS38 (NEW ENGLAND BIOLABS社製)、*Cla* Iで消化した断片と *Cla* I/*Eco* RIで消化した断片はpBluescriptII KS+ (STRATAGENE社製) にライゲーションし、サブクローニングした。続いて *Not* Iサイトの導入にはQuickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社製) を使った。それぞれの導入に用いたプライマーはNP-P間ではセンス鎖: 5'-ccaccgaccacaccacagcgccgcgacagccacggcttcgg-3' (配列番号: 19)、アンチセンス鎖: 5'-ccgaagccgtggctgtcgcggccgctgggtgtggtcgggtgg-3' (配列番号: 20)、P-M間ではセンス鎖: 5'-gaaatttcacctaagcgccgcaatggcagatatctatag-3' (配列番号: 21)、アンチセンス鎖: 5'-ctatagatatctgccattgcggccgcttaggtgaaatttc-3' (配列番号: 22)、M-F間ではセンス鎖: 5'-gggataaagtccttgcggccgcttggttgcaaaaactctcccc-3' (配列番号: 23)、アンチセンス鎖: 5'-gggagagttttgcaaccaagcgccgcaaggactttatccc-3' (配列番号: 24)、F-HN間ではセンス鎖: 5'-ggtcgcgcggtacttttagcgccgcctcaaacaagcacagatcatgg-3' (配列番号: 25)、アンチセンス鎖: 5'-ccatgatctgtgcttggttgaggcgccgctaaagtaccgcgcgacc-3' (配列番号: 26)、HN-L間ではセンス鎖: 5'-cctgcccacatccatgacctagcggcgcttcccattcaccctggg-3' (配列番号: 27)、アンチセンス鎖: 5'-cccagggtgaatgggaagcgccgctaggtcatggatgggcagg-3' (配列番号: 28) をそれぞれ合成し、

用いた。

鑄型としてNPP間は*Sal*I/*Sph*I断片、PM間、MF間は*Cla*I断片、FHN間、HNL間は*Cla*I/*Eco*RI断片をそれぞれ上記でサブクローニングしたものを用いてQuickchange Site-Directed Mutagenesis kitのプロトコルに従い、導入を行った。導入したものを再びサブクローニングした酵素で消化して同様に回収・精製し、元のセンダイゲノムcDNAへアセンブリした。その結果、図45(B)のように各遺伝子間に新たに*Not*Iを導入した5種類 (pSeV(+)NPP、pSeV(+)PM、pSeV(+)MF、pSeV(+)FHNおよびpSeV(+)HNL) のセンダイウイルスゲノムcDNAを構築した。

遺伝子発現量を見るためのレポータ遺伝子としてヒト分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) をPCRでサブクローニングした。プライマーには*Asc*I制限酵素サイトを付加した5' プライマー : 5'-gcggcgcccatgctgctgctgctgctgctgctggccgtg-3' (配列番号 : 29)、3' プライマー : 5'-gcggcgcccttatcatgtctgctcgaaggccggccg-3' (配列番号 : 30) を合成し、PCRを行った。鑄型にはpSEAP-Basic (CLONTECH社製)、酵素には*Pfu* turbo DNAポリメラーゼ (STRATAGENE社製) を用いた。PCR後、産物を*Asc*Iで消化し、電気泳動により精製・回収した。サブクローニングするプラスミドとしてpBluescriptII KS+の*Not*Iサイトにマルチクローニングサイト (*Pme*I-*Asc*I-*Swa*I) と終結シグナル-介在配列-開始シグナル含む合成二本鎖DNA [センス鎖 : 5'-gcggccgcgtttaaacggcgccatttaaaccgtagtaagaaacttagggtgaaagttcatcgcgccgc-3' (配列番号 : 31)、アンチセンス鎖 : 5'-gcggccgcgatgaactttcaccctaagtttttcttactacggatttaaattggcgccgtttaaacgcggccgc-3' (配列番号 : 32)] を組み込んだものを作製した (図46)。このプラスミドの*Asc*Iサイトに精製・回収したPCR産物をライゲーションし、クローニングした。これを*Not*Iで消化してSEAP遺伝子断片を電気泳動で回収・精製し、上記の5種類のセンダイウイルスゲノムcDNAとpSeV18+の*Not*Iサイトにそれぞれライゲーションし組み込んだ。それぞれのウイルスベクターをpSeV(+)NPP/SEAP、pSeV(+)PM/SEAP、pSeV(+)MF/SEAP、pSeV(+)FHN/SEAP、pSeV(+)HNL/SEAPおよびpSeV18(+)

/SEAPとした。

#### <ウイルスの再構築>

LLC-MK2細胞を $2 \times 10^6$  cells/dish で100mmシャーレに蒔き、24時間後培養後、ソラレンとUV処理したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7) (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) に室温でmoi=2で1時間感染させた。細胞を洗浄してからSEAPを組み込んだ各センダイウイルス cDNA、pGEM/NP、pGEM/P、およびpGEM/Lをそれぞれ12 $\mu$ g、4 $\mu$ g、2 $\mu$ g、及び4 $\mu$ g/dishの量比でOptiMEM (GIBCO BRL社製) に懸濁し、110 $\mu$ l のSuperFect transfection reagent (QIAGEN社製) を入れて混合し、室温で15分放置後、最終的に3%FBSを含むOptiMEM 3mlを加え、細胞に添加して3~5時間培養した。培養後、細胞を血清を含まないMEMで2回洗浄し、シトシン $\beta$ -D-アラビノフラノシド (AraC) を含むMEMで72時間培養した。これらの細胞を回収し、ペレットを1mlのPBSで懸濁し、凍結融解を3回繰り返した。これらを10日間孵卵させた鶏卵に100 $\mu$ l接種し、35 $^{\circ}$ Cで3日間孵卵させたのち、尿液を回収した。ワクシニアウイルスフリーにするため、これら回収した尿液をさらに $10^{-5}$  ~  $10^{-7}$  に希釈して鶏卵に再接種し、同様に回収し、分注して-80 $^{\circ}$ Cにストックした。それぞれのウイルスベクター名をSeVNPP/SEAP、SeVPM/SEAP、SeVMF/SEAP、SeVFHN/SEAP、SeVHNL/SEAPおよびSeV18/SEAPとする)。

#### <ブランクアッセイによるタイターの測定>

CV-1細胞を6well プレートに1wellあたり $5 \times 10^5$  cellsずつ蒔き、24時間培養した。PBS洗浄後、BSA/PBS (1% BSA in PBS) で $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  に希釈した組換えSeVを1時間インキュベーションした後、PBSで洗浄、BSA/MEM/アガロース (0.2% BSA+2 $\times$ MEMと等量の2%アガロースを混合したもの) をwellあたり3mlずつ重層し、6日間37 $^{\circ}$ C、0.5%で培養した。培養後、3mlのエタノール/酢酸 (エタノール: 酢酸=1:5) を加え、3時間放置し、アガロースとともに除去した。PBSで

三回洗浄後、100倍希釈したウサギ抗センダイウイルス抗体で室温で1時間インキュベーションした。PBSで三回洗浄後、200倍希釈したAlexa Flour™ 標識ヤギ抗ウサギIg(G+H) (Molecular Probe社) を加えて室温で1時間インキュベーションした。PBSで三回洗浄後、ルミノイメージアナライザーLAS1000 (富士フィルム) で蛍光画像を取り込み、ブランクを測定した。結果を図47に示す。またこれから得られたタイターの結果を表3に示す。

表3 プラークアッセイの結果から測定した各組換えセンダイウイルスのタイターの結果

組み換えウイルス	タイター (pfu/ml)
SeV18/SEAP	3.9X10 <sup>9</sup>
SeVNPP/SEAP	4.7X10 <sup>8</sup>
SeVPM/SEAP	3.8X10 <sup>9</sup>
SeVMF/SEAP	1.5X10 <sup>10</sup>
SeVFHN/SEAP	7.0X10 <sup>9</sup>
SeVHNL/SEAP	7.1X10 <sup>9</sup>

#### <レポーター遺伝子発現の比較>

LLC-MK2細胞を6well プレートに1wellあたり1~5×10<sup>5</sup> cellsずつ蒔き、24時間培養した後、各ウイルスベクターをmoi=2感染させ、24時間後培養上清を100 μl 回収し、SEAPアッセイを行った。アッセイはReporter Assay Kit -SEAP- (東洋紡) で行い、ルミノイメージアナライザーLAS1000 (富士フィルム) で測定した。測定値はSeV18+/SEAPの値を100としてそれぞれ相対値として表した。その結果、図48に示したいずれの位置にSEAP遺伝子を挿入した場合でもSEAP活性が検出された。SEAP活性はゲノムの下流に位置するに従って下がり、すなわち発現量が下がっていることがわかった。また、NP遺伝子とP遺伝子の間にSEAP遺伝子を挿入した場

合には、NP遺伝子の上流にSEAP遺伝子を挿入したベクターと、P遺伝子とM遺伝子の間にSEAP遺伝子を挿入したベクターの中間の発現量が検出された。

【実施例 16】 ダブル欠失 $\Delta$ F-HN細胞重層法による欠失SeV増幅効率の向上

現在用いているSeVウイルスの再構築法では、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニア(vTF7-3)を用いるため、ワクシニアの細胞傷害性により、感染細胞が一部分死滅しており、再構築を行った一部の細胞でウイルスが増幅することができても、さらに多くの細胞で効率よく、持続的に増幅できるようにすることが好ましい。しかし、パラミクソウイルスでは同型ウイルスのFとHN蛋白が細胞表面に共に存在すると細胞融合を引き起こし、シンシチュムが形成されることが知られている (Lamb and Kolakofsky, 1996, Fields virology, p1189)。それ故FHN共発現細胞の継代が困難であった。そこで、これらの再構築された細胞に新たに欠失蛋白 (FおよびHN) を発現するヘルパー細胞を重層することにより欠失ウイルスの回収効率を向上することができると考えた。FHN発現誘導時間が異なる細胞を重層することを検討することによりFHN共欠失ウイルス回収効率を大きく向上した。

10cm細胞培養皿に100%コンフレントになったLLC-MK2細胞 ( $1 \times 10^7$ /dish)をPLWUV-処理ワクシニアをmoi=2で室温において感染1時間後、d2EGFPを搭載するFHN欠失cDNA (pSeV18'/ $\Delta$ FHN-d2GFP (実施例 8)), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/FHNをそれぞれ、12 $\mu$ g/10cm dish, 4 $\mu$ g/10cm dish, 2 $\mu$ g/10cm dish, 4 $\mu$ g/10cm dish, 4 $\mu$ g/10cm dishの量比で混合し (final vol, 3ml/10cm dish)、遺伝子導入試薬 SuperFect(QIAGEN)を用いて、前述したF欠失ウイルスの再構築と同様な方法でLLC-MK2細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入3時間後細胞を無血清培地で3回洗浄し、低速遠心(1000rpm/2min)で剥がれた細胞を回収し、シトシン $\beta$ -D-アラビノフラノシド (AraC) 40 $\mu$ g/ml, SIGMA), トリブシン(7.5 $\mu$ g/ml, GIBCO)を含むの無血清MEM培地に懸濁し、細胞に加え、一晚培養した。別途に用意した10cmシャーレで100%コンフレントになったFHN共発現細胞をアデノウイルスAxCANCre

をMOI=10で発現誘導後、4時間、6時間、8時間、2日目、3日目の細胞をそれぞれ5ml PBS(-)で一回洗浄し、cell dissociation solution (SIGMA)により細胞を剥がし、低速遠心(1000rpm/2min)で細胞を集め、AraC(40 $\mu$ g/ml, SIGMA)、トリプシン(7.5 $\mu$ g/ml, GIBCO)を含むの無血清MEM培地に懸濁し、FHN共欠失ウイルスの再構築した細胞(P0)に加え一晩培養した。細胞重層後2日目で蛍光顕微鏡で細胞を観察し、細胞におけるGFPの発現でウイルスの広がりを確認した。その結果、図49に示した。細胞重層しない従来の場合(左)に比べ、細胞を重層した場合(右)は重層された細胞の方がGFP発現細胞が顕著に多く認められた。これらの細胞を回収し、10<sup>7</sup>細胞/mlのOpti-MEM培地(Gibco)に懸濁し、3回凍結融解したライセートを調製し、発現誘導して2日後のFHN共発現細胞に10<sup>6</sup> cells/100 $\mu$ l/well感染し、AraC(40 $\mu$ g/ml, SIGMA)、トリプシン(7.5 $\mu$ g/ml, GIBCO)を含むの無血清MEM培地で、37°C 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで2日間培養したP1細胞培養上清のウイルス力価をCIU-GFPで測定した(表4)。その結果、FHN発現誘導後4時間ではウイルスの増幅効果が認められず、誘導6時間以後の細胞重層による増幅効果が顕著に認められた。特に、P1細胞上清中に放出されたウイルスは6時間後の細胞重層する方が細胞重層しない方に比べ約10倍に上った。

表4 ダブル欠失 $\Delta$ F-HN細胞重層法による欠失SeV増幅

GFP -CIU		x10 <sup>3</sup> /ml				
		FHNcell+ad/cre				
FHN cell-		4h	6h	8h	2d	3d
8-10		6-9	80-100	70-100	60-100	20-50

【実施例17】 シュードタイプセンダイウイルスがF欠失型ゲノムを有することの確認

VSV-G遺伝子発現で増殖した上記ウィルスがF欠失型であることを、感染細胞抽出液のタンパク質のウェスタン解析により調べた。その結果、センダイウィルス由来のタンパク質は検出されるものの、Fタンパク質は検出されなかったことから、F欠失型であることが確認された（図50）。

【実施例18】 FおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスの抗VSV抗体による感染性の影響

VSV-G発現株を用いて得られたFおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスが、外被にVSV-Gタンパク質を有するかに関して、抗VSV抗体を用いて感染性が影響されるかどうかの中和活性を調べた。ウィルス液と抗体を混合し、室温で30分静置後、VSV-Gを誘導発現していないLLCG-L1細胞に感染し、4日目の遺伝子導入能をGFP発現細胞の有無で調べた。その結果、FおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルス（図中VSV-G）は、抗VSV抗体で感染性の完全な抑制が認められたが、本来の外被を有するセンダイウィルス（図中F, HN）では抑制が認められなかった（図51）。このことから、本実施例で得られたウィルスが、外被にVSV-Gタンパク質を有するシュードタイプのセンダイウィルスであり、抗体によりその感染性が特異的に抑えられることが明らかとなった。

【実施例19】 F遺伝子とFおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスの密度勾配超遠心法を用いた精製

ウィルス感染細胞の培養上清を用いて、ショ糖密度勾配遠心を行い、F遺伝子とFおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスの分画精製を行った。20～60%のグラジェントを形成させたショ糖溶液にウィルス液を上層させ、SW41ローター（Beckman）で29000rpm、15～16時間超遠心を行った。超遠心後チューブの底に穴を開け、フラクションコレクターで300 $\mu$ lずつ分画した。各画分について、F遺伝子あるいはFおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有し、外被にVSV-Gタンパク質を有するシュードタイプのセンダイウィルスであること

をウェスタン解析により調べた。ウェスタン解析は、上記に記載の方法により行った。その結果、F欠失型のシュードタイプセンダイウィルスでは、センダイウィルス由来のタンパク質およびHNタンパク質、VSV-Gタンパク質は同フラクションに検出されるものの、Fタンパク質は検出されなかったことから、F欠失型シュードタイプのセンダイウィルスであることが確認された。一方、FおよびHN欠失型のシュードタイプセンダイウィルスでは、センダイウィルス由来のタンパク質、VSV-Gタンパク質は同フラクションに検出されるものの、FおよびHNタンパク質は検出されなかったことから、FおよびHN欠失型のシュードタイプのセンダイウィルスであることが確認された（図52）。

【実施例20】 F遺伝子とFおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスによる赤血球凝集反応の回避

F遺伝子、またはF、HN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルス、あるいは本来の外被を有するセンダイウィルスをLLC-MK2細胞に感染させ、3日目に1%トリ赤血球浮遊液を加え4℃で30分静置後、GFPを発現した感染細胞表面を観察した。その結果、F遺伝子を欠失したゲノムを有するウィルス（SeV/ $\Delta$ F、およびVSV-Gでシュード化した SeV/ $\Delta$ F(VSV-G)）シュードタイプセンダイウィルスは本来の外被を有するセンダイウィルスと共に、感染細胞の表面に凝集反応が起きているのが確認された。一方、FおよびHN遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルス（SeV/ $\Delta$ F-HN(VSV-G)）では、感染細胞上に凝集は全く起きていないことが明らかとなった（図53）。

【実施例21】 F遺伝子を欠失したゲノムを有するVSV-Gシュードタイプセンダイウィルスによる培養細胞への感染特異性

培養細胞へのF遺伝子を欠失したゲノムを有するVSV-Gシュードタイプセンダイウィルスの感染効率は、細胞に感染後3日目の生細胞に発現したGFP量をFlow cytometryを用いて測定した。F遺伝子を欠失したゲノムを有するシュードタイプセンダイウィルスと本来の外被を有するセンダイウィルスで、ほぼ同じ感染効率

を示すLLC-MK2細胞をコントロールとして比較を行った。その結果、ヒト卵巣ガン細胞HRAでの感染効率は、LLC-MK2細胞とほとんど差異はなかったが、T細胞系のJurkat細胞では、コントロールと比較して2倍程度のF遺伝子を欠失したゲノムを有するVSV-Gシュードタイプセンダイウィルスの感染効率の上昇が観察された(図54)。

【実施例22】 NGF発現を搭載したF欠失型センダイウィルスベクターの作製  
<NGF/SeV/ $\Delta$ Fの再構成>

NGF/SeV/ $\Delta$ Fの再構成は上記「エンベローププラスミド+F発現細胞重層法」に従って行った。また、タイターの測定は、抗SeVポリクローナル抗体を用いた方法に従って行った。

<NGF/SeV/ $\Delta$ Fのウィルスゲノム確認(RT-PCR)>

NGF/SeV/ $\Delta$ Fウィルスゲノム(図55上)を確認するため、LLC-MK2/F7細胞から回収された培養上清を遠心した後、QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) でそのプロトコールに従ってRNA抽出を行った。このRNAをSUPERSCRIPT™ ONE-STEP™ RT-PCR SYSTEM (GIBCO BRL) によりRT-PCRのテンプレート合成およびPCRを行った。対照群は、付加型SeV cDNA (pSeV18<sup>+</sup> b(+)) (Hasan, M. K. et al., J. General Virology 78: 2813-2820, 1997) を用いた。PCRプライマーはNGF-NとNGF-Cを用いて行った。NGF-Nについては、フォワード: ACTTGCGGCCGCCAAAGTTCAGTAATGTCCA TGTTGTTCTACACTCTG (配列番号: 33)、NGF-Cについては、リバーズ: ATCCGCGGC CGCGATGAACTTTACCCCTAAGTTTTCTTACTACGGTCAGCCTCTTCTTGTAGCCTTCCTGC (配列番号: 34) を使用した。その結果、NGF-NとNGF-Cとをプライマーに用いた場合は、RT条件下でNGF/SeV/ $\Delta$ FはNGFに特異的なバンドが検出された。対照群にはバンドは検出されなかった(図55下)。

【実施例23】 NGF遺伝子を搭載したF欠失型SeVの細胞感染後に発現するNGF蛋白の定量とin vitro活性測定

感染及びNGF蛋白の発現は、直径10cm或いは直径6cmプレートにほぼconfluent

に増殖させたLLC-MK2/F或いはLLC-MK2細胞を用いて行った。NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFPはLLC-MK2/F細胞に、NGF/SeV及びGFP/SeVはLLC-MK2細胞にm.o.i. 0.01で感染させ、7.5 $\mu$ g/mLのTrypsin (GIBCO) を含み血清を含まないMEM培地で3日間培養した。3日後ほぼ100%の細胞が感染した後に、Trypsin及び血清を共に含まないMEM培地に交換し更に3日間培養した。それぞれの培養上清を回収し、48,000 $\times$ gにて60分遠心後、上清についてNGF蛋白の定量及びin vitro活性測定を行った。本実施例では、F欠失型SeV (NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP) (図5参照) をLLC-MK2/F細胞に感染させているが、高 m.o.i. (例えば1或いは3) を感染すれば、即ちはじめから100%近い細胞に感染すれば、当然のことながらF非発現細胞でも同様の結果を示す実験を行うことができる。

NGF蛋白の定量はELISA KitであるNGF Emax Immuno Assay System (Promega) を利用した。プロトコールは添付文書の指示に従った。NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP及びNGF/SeVの感染細胞培養上清中にはそれぞれ 32.4 $\mu$ g/mL, 37.4 $\mu$ g/mL 及び 10.5 $\mu$ g/mLのNGF蛋白の存在が確認された。NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFPの感染細胞培養上清中には、高濃度のNGF蛋白が存在しNGF/SeVの感染細胞培養上清中のNGF蛋白量と同程度であり、F欠失型SeVによっても十分量のNGFの発現があることが確認された。

NGF蛋白のin vitro活性測定は、ニワトリの感覚神経である後根神経節の初代神経細胞分散培養系での生存維持活性を指標に行った (Nerve Growth Factors (Wiley, New York), pp.95-109 (1989))。胎生10日齢のニワトリ胚より後根神経節を取り出し、0.25% Trypsin (GIBCO) で37°C 20分処理後分散した。100 units/mLのpenicillin (Gibco), 100units/mLのstreptomycin (Gibco), 250ng/mLのamphotericin B (Gibco), 20 $\mu$ Mの2-deoxyuridine (Nakarai), 20 $\mu$ Mの5-fluorodeoxyuridine (Nakarai), 2mM L-glutamine (Sigma)及び5%の血清を含む高グルコースのD-MEM培地を使用し、96-wellプレートに1wellあたり約5000個の細胞密度で培養を開始した。プレートはpolylysinコートした96-wellプレート(Iwaki)

を更にlaminin (Sigma) でコートして準備した。培養開始時にコントロールであるNGF蛋白或いは先に調製したSeV感染後の培養上清を添加した。3日後、顕微鏡下で細胞を観察すると共に、Alamer blue (CosmoBio) を添加しミトコンドリアによる還元活性を指標として (530nmで励起した590nmの蛍光強度を測定) 生細胞の定量を行った。コントロール (NGF添加無し) 及びSeV/付加型-GFP (GFP/SeV) の感染細胞培養上清の添加 (1/1000希釈) では同程度の生細胞を示す蛍光強度であったが、NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP及びNGF/SeVの感染細胞培養上清を添加 (1/1000希釈) することにより、顕著な蛍光強度の上昇が見られ生細胞数が多く生存維持活性を有していると判断された (図5 6)。そして、その値はELISAにより求めたNGF蛋白量の添加に匹敵する効果であった。同様のことが顕微鏡下で視覚的にも観察され、NGF/SeV/ $\Delta$ F, NGF/SeV/ $\Delta$ F-GFP及びNGF/SeVの感染細胞培養上清を添加することにより、生細胞数の増加と顕著な突起伸展が観察された (図5 7)。即ち、NGF搭載F欠失型SeVの感染によって発現されるNGFは活性型として発現していると確認された。

#### [実施例 2 4] F発現細胞の詳細な解析

##### 1) Adeno-Creのmoiと誘導時間

異なるAdeno-Creのmoiを使ってLLC-MK2/Fに感染させF蛋白の発現を誘導した後、蛋白の発現量と細胞の形態変化を調べた。

moi=1の場合に比べmoi=10の場合発現量が若干高かったが (図5 8)、誘導後6h、12h、24h、48h後の発現量を調べたところ、いずれも誘導後48時間目にF蛋白の発現量が高いことが分かった。

また、moi=1、3、10、30、100で細胞に感染して細胞の形態変化を経時的に観察したが、moi=10までに細胞間に顕著の差が認められなかったが、moi=30以上になると細胞傷害性が観察された (図5 9)。

##### 2) 継代数

LLC-MK2/Fに対してAdeno-Creを使ってF蛋白の発現を誘導してから7代まで継代し

、細胞のFの発現量と細胞の形態を顕微鏡観察で調べた。一方、F蛋白の発現を誘導してから20代まで継代した細胞内F蛋白の存在状態をレーザー顕微鏡を用いて調べた。

レーザー顕微鏡観察においては、チャンバーガラスにF蛋白の発現を誘導したLLC-MK2/F細胞を入れ、一晚培養した後、培地を取り除きPBSで一回洗浄してから、3.7%のFormalin-PBSで5分間固定した。その後、PBSで細胞を一回洗浄した後、0.1% Triton X100-PBSで5分間処理して、抗F蛋白モノクローナル抗体( $\gamma$ -236)(100倍希釈)とFITC標識山羊抗ウサギIgG抗体(200倍)の順で細胞を処理して、最後にPBSで洗浄してレーザー顕微鏡をもって観察した。

その結果、7代目まで継代した細胞のF蛋白の発現量に差はなかった(図60)。形態的にも、そしてSeVの感染性と生産性にも顕著な差が観察されなかった。一方、20代目まで継代した細胞を免疫抗体法で細胞内のF蛋白の存在状況を調べたところ、15代まで大きな差がなかったが、それ以上継代した細胞内にF蛋白の局在化傾向が観察された(図61)。

以上の結果から、F欠失型SeVの生産には継代後15代目までの細胞が望ましいと判断される。

#### 【実施例25】 GFP-CIUと抗SeV-CIUとの相関関係

2種類の方法によるCIU (Cell-Infected Unit) の測定結果を相関関係を調べた。LLC-MK2細胞を $2 \times 10^5$  cells/dishで12well-plateに蒔き、24時間培養後、血清を含まないMEM培地で1回洗浄した後、SeV/ $\Delta$ F-GFPを100 $\mu$ l/wellで感染した。15分後、血清を含まないMEM培地を1ml/well加え、さらに24時間培養した。培養後、PBS(-)で3回洗浄した後、細胞を乾燥させ(約10分～15分室温放置)、細胞を固定するため、アセトンで1 ml/well加え直ちに除去し、再び乾燥させた(約10分～15分室温放置)。PBS(-)で100倍希釈したウサギより調製された抗SeVポリクローナル抗体(DN-1)を300 $\mu$ l/well加え、37°Cで45分間インキュベートした後、PBS(-)で3回洗浄し、PBS(-)で200倍希釈した抗ウサギIgG(H+D)蛍光標識二次抗体 (Alex<sup>TM</sup>

568: Molecular Probes社製)を300 $\mu$ l/well加え、37°Cで45分間インキュベートした。PBS(-)で3回洗浄した後、蛍光顕微鏡下 (Emission: 560nm, Absorption: 645nm フィルター:ライカ社製) で蛍光を発する細胞を観察した。

対照として SeV/ $\Delta$ F-GFP を100 $\mu$ l/wellで感染し15分後、血清を含まないMEMを1 ml/well加え、さらに24時間培養後、以後の操作を行わずに細胞を蛍光顕微鏡下 (Emission: 360nm, Absorption: 470nm フィルター:ライカ社製) でGFP発現細胞を観察した。

両者の蛍光強度を定量化して関係を評価したところ、良好な相関を示した (図62)。

#### [実施例26] マルチクローニングサイトの作製

マルチクローニングサイトをSeVベクターに付加させた。方法は以下の二種類。

- 1) センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18<sup>+</sup> のcDNAのゲノム中のいくつかの制限酵素サイトを壊し、つぶした制限酵素サイトを含む新たな制限酵素サイトを各遺伝子のスタートシグナルとATG翻訳開始シグナルの間に導入した。
- 2) すでに構築したSeVベクターcDNAにマルチクローニングサイト配列と転写開始シグナル-介在配列-終結シグナルを付加させてNotIサイトへ組み込む。

1) の場合、導入方法としてはまず、pSeV18<sup>+</sup> をEag Iで消化した断片 (2644bp)、Cla Iで消化した断片 (3246bp)、ClaI/Eco RIで消化した断片 (5146bp)、及びEco RIで消化した断片 (5010bp) をそれぞれアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN社製) で回収・精製した。Eag Iで消化した断片はLITMUS38 (NEW ENGLAND BIOLABS社製)、Cla Iで消化した断片、ClaI/Eco RIで消化した断片、及びEco RIで消化した断片はpBluescriptII KS<sup>+</sup> (STRATAGENE社製) にライゲーションし、サブクローニングした。続いて制限酵素サイトの破壊、導入にはQuickchange Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社製) を使った。

制限酵素サイトの破壊にはSal I: (センス鎖) 5'-ggagaagtctcaacaccgtccaccc

aagataatcgatcag-3' (配列番号 : 35)、(アンチセンス鎖) 5'-ctgatcgattatcttgggtggacgggtgttgagacttctcc-3' (配列番号 : 36)、Nhe I: (センス鎖) 5'-gtat atgtgttcagttgagcttgcgtcggtctaagc-3' (配列番号 : 37)、(アンチセンス鎖) 5'-gccttagaccgacagcaagctcaactgaacacatatac-3' (配列番号 : 38)、Xho I: (センス鎖) 5'-caatgaactctctagagaggctggagtcactaaagagttacctgg-3' (配列番号 : 39)、(アンチセンス鎖) 5'-ccaggttaactctttagtgactccagcctctctagagagttcattg-3' (配列番号 : 40)、また制限酵素導入にはNP-P間: (センス鎖) 5'-gtgaaagt tcatccaccgatcggtcactcgaggccacaccaacccccaccg-3' (配列番号 : 41)、(アンチセンス鎖) 5'-cgggtggggttgggtgtggcctcgagtgcgagccgatcggtggatgaactttcac-3' (配列番号 : 42)、P-M間: (センス鎖) 5'-cttaggggtgaaagaaatttcagctagcacggcgcaatggcagatatac-3' (配列番号 : 43)、(アンチセンス鎖) 5'-gatatctgccattgcgccgtgctagctgaaatttctttcaccctaag-3' (配列番号 : 44)、M-F間: (センス鎖) 5'-cttagggataaagtccttgtgcgcgcttggttgcaaaactctcccc-3' (配列番号 : 45)、(アンチセンス鎖) 5'-ggggagagttttgcaaccaagcgcgcacaaaggactttatccctaag-3' (配列番号 : 46)、F-HN間: (センス鎖) 5'-ggtcgcgcggtacttttagtcgacacctcaaacaagcagatcatgg-3' (配列番号 : 47)、(アンチセンス鎖) 5'-ccatgatctgtgcttgtttgaggtgtcgactaaagtaccgcgcgacc-3' (配列番号 : 48)、HN-L間: (センス鎖) 5'-ccagggtgaatgggaaggcgccagggtcatggatgggcaggagtcc-3' (配列番号 : 49)、(アンチセンス鎖) 5'-ggactcctgcccattcatgacctggccggcccttcccattcaccctggg-3' (配列番号 : 50) をそれぞれ合成し反応に用いた。導入後、それぞれの断片を上記同様に回収・精製し、cDNAをアセンブリした。

2) の場合、(センス鎖) 5'-ggccgcttaattaacggtttaaacgcgcgccaacagtggtgataa gaaaaacttaggggtgaaagttcatcac-3' (配列番号 : 51)、(アンチセンス鎖) 5'-ggc cgtgatgaactttcaccctaagtttttcttatcaaacactgttggcgcgcgtttaaacggttaattaagc-3' (配列番号 : 52) を合成し、それぞれの合成DNAをリン酸化し、85°C 2分、65

°C 15分、37°C 15分、室温 15分でアニーリングさせ、SeV cDNAへ組み込む。ある

いはpUC18またはpBluescriptII等のマルチクローニングサイトを終結シグナル-  
介在配列-開始シグナル含むプライマーでPCRしてサブクローニングし、これをSe  
V cDNAへ組み込む。できたcDNAでのウイルス再構成は上記の通り行う。

#### 産業上の利用の可能性

少なくとも一つのエンベロープ遺伝子が欠損したパラミクソ科ウイルスに由来  
するRNPおよびそのベクターとしての利用が提供された。好ましい態様として、RNP  
とカチオン性化合物との複合体からなるベクターが提供された。これにより標的  
細胞に導入する際の抗原性や細胞傷害性の問題を回避することが可能である。

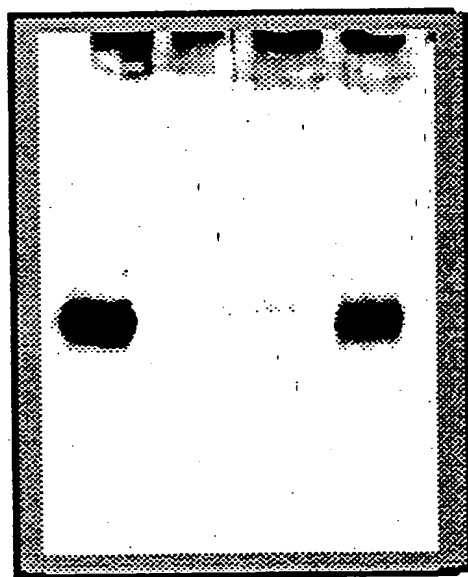
## 請求の範囲

1. (a) パラミクソ科ウイルスの少なくとも一つのエンベロープタンパク質を発現しないように改変された、パラミクソウイルスに由来する (一) 鎖一本鎖RNA、および (b) 該 (一) 鎖一本鎖RNAによりコードされる、該RNAに結合するタンパク質、からなる複合体。
2. (一) 鎖一本鎖RNAがNPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質を発現し、Fタンパク質、HNタンパク質、若しくはMタンパク質またはこれらの組み合わせを発現しないように改変されている、請求項1に記載の複合体。
3. (一) 鎖一本鎖RNAがセンダイウイルスに由来する、請求項1または2に記載の複合体。
4. (一) 鎖一本鎖RNAが、さらに外来遺伝子をコードしている、請求項1から3のいずれかに記載の複合体。
5. 請求項4に記載の複合体およびカチオン性脂質を含む遺伝子導入用組成物。
6. 請求項4に記載の複合体およびカチオン性ポリマーを含む遺伝子導入用組成物。
7. 請求項5または6に記載の遺伝子導入用組成物を細胞に導入する工程を含む、該細胞内で外来遺伝子を発現させる方法。

1 / 6 2

☒ 1

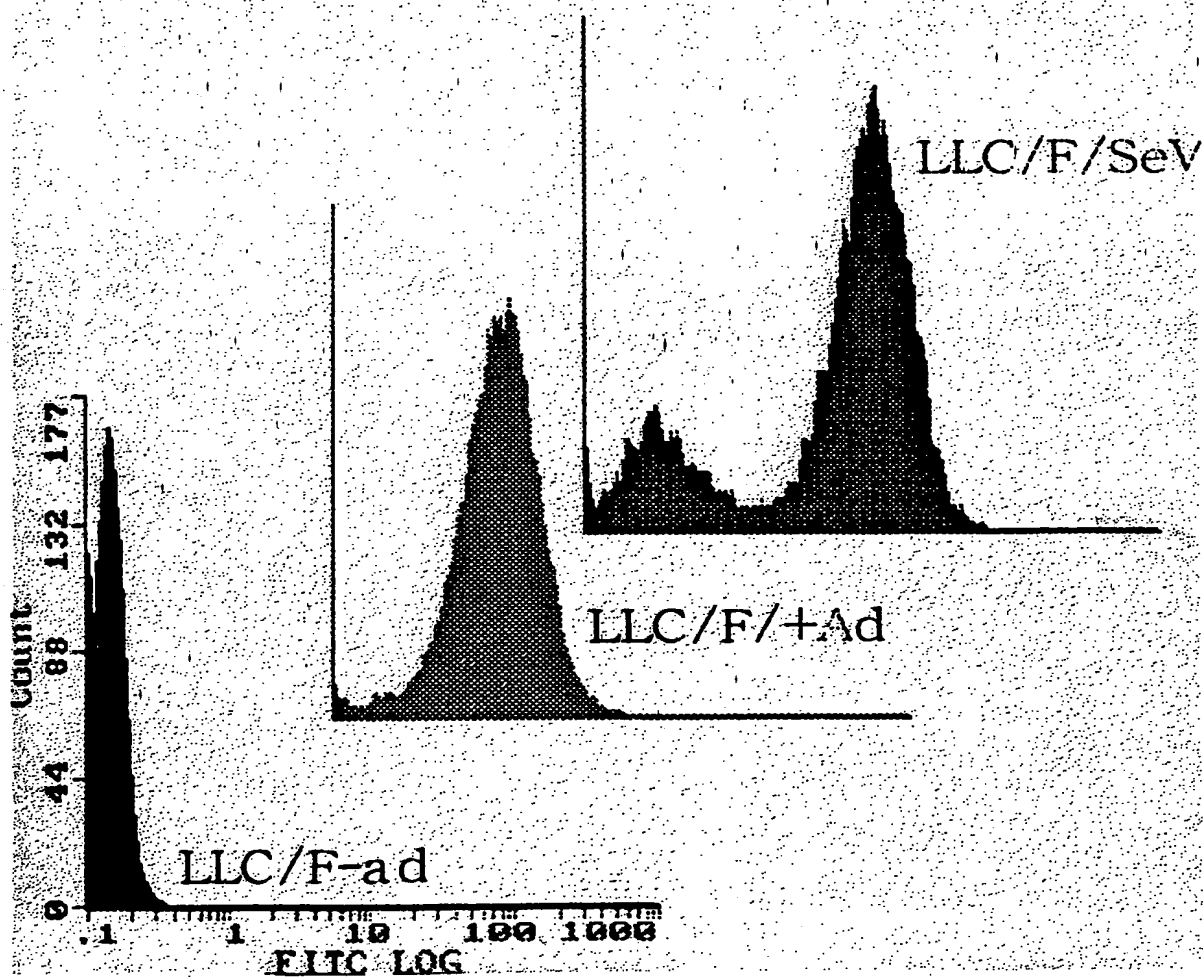
LLC-MK2/SeV  
LLC-MK2  
LLC-MK2/F7  
LLC-MK2/F7/Ad-Cre



65k

2 / 6 2

2



3 / 6 2

☒ 3



1: SeV virions

2: LLCMK2

3: LLC/F7-trypsin

4: LLC/F7+trypsin

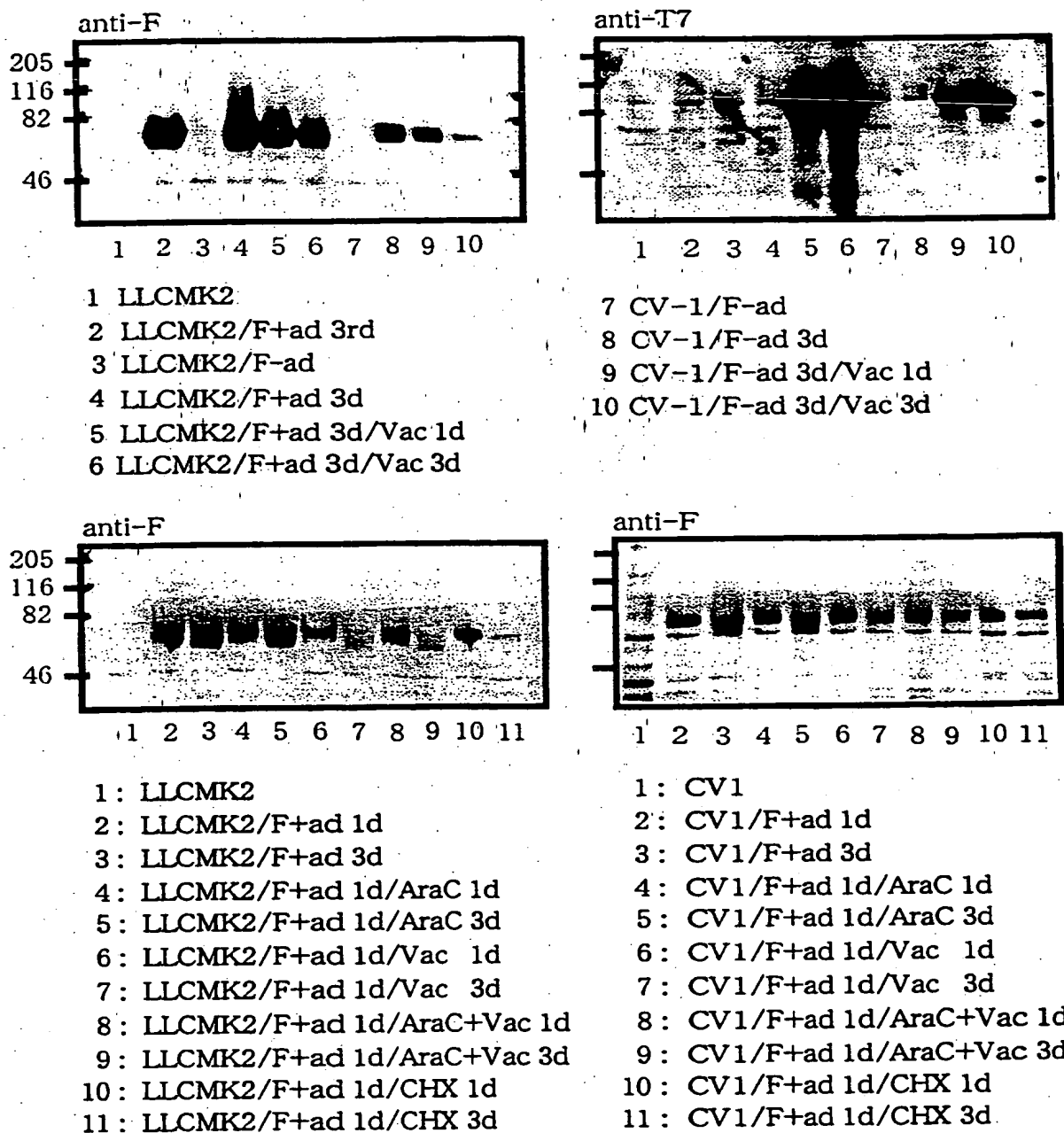
← F0

← F1

← F2

5 / 6 2

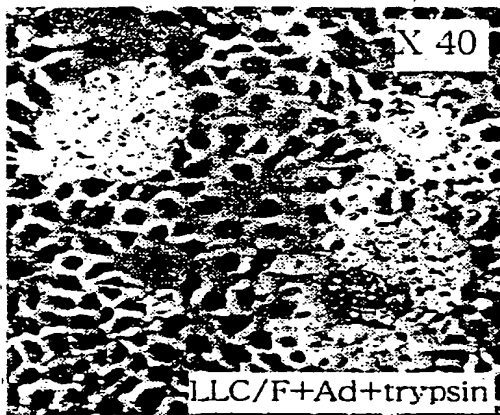
図 5



4 / 6 2

図 4

pCAG/HN

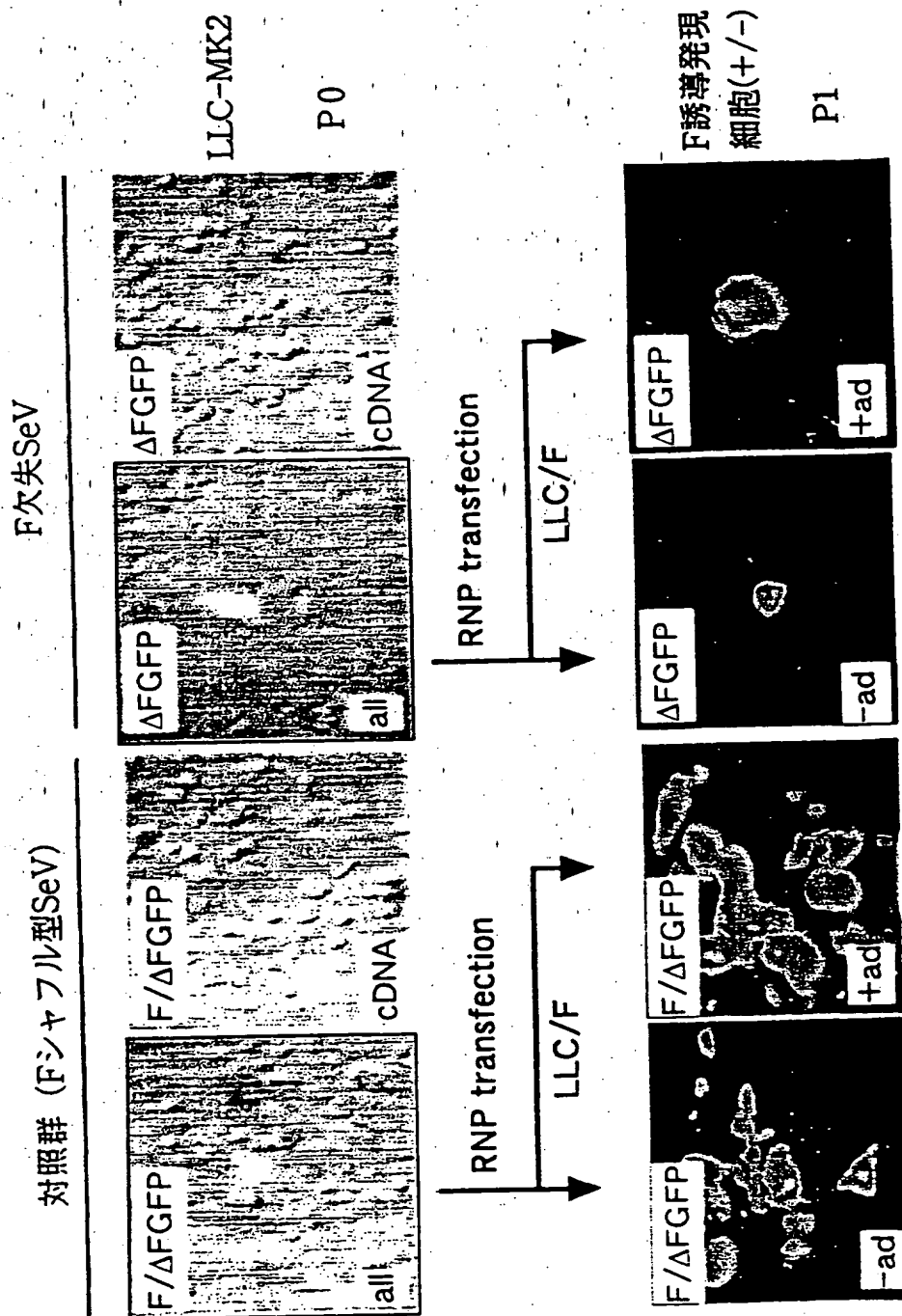


pCAG/HN



6 / 6 2

図 6



7 / 6 2

☒ 7

LLCMK2/F  
P1/24 well



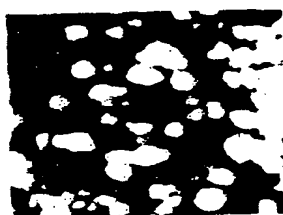
Sup

RNP

RNP/o

RNP/t

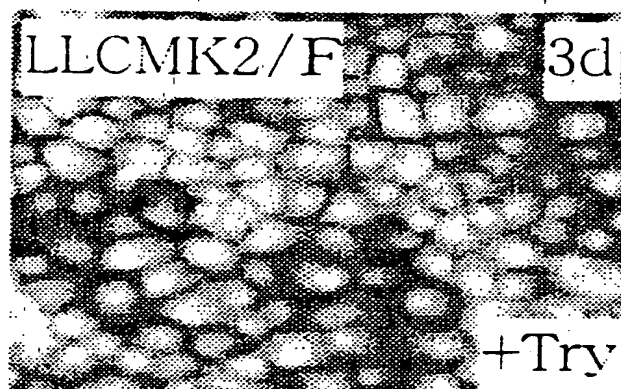
LLCMK2/F  
P2/12 well



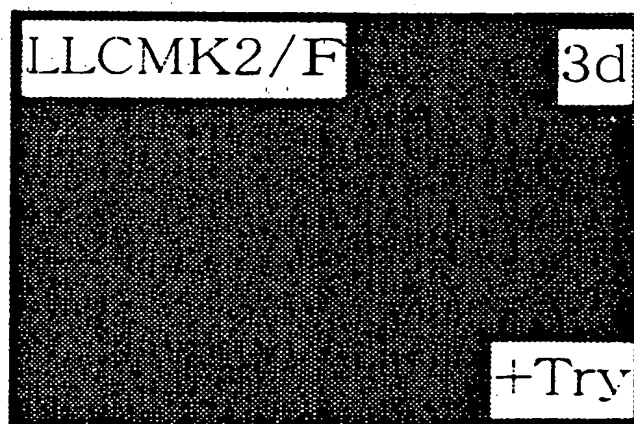
9 / 6 2

図 9

LLCMK2/F supによる感染

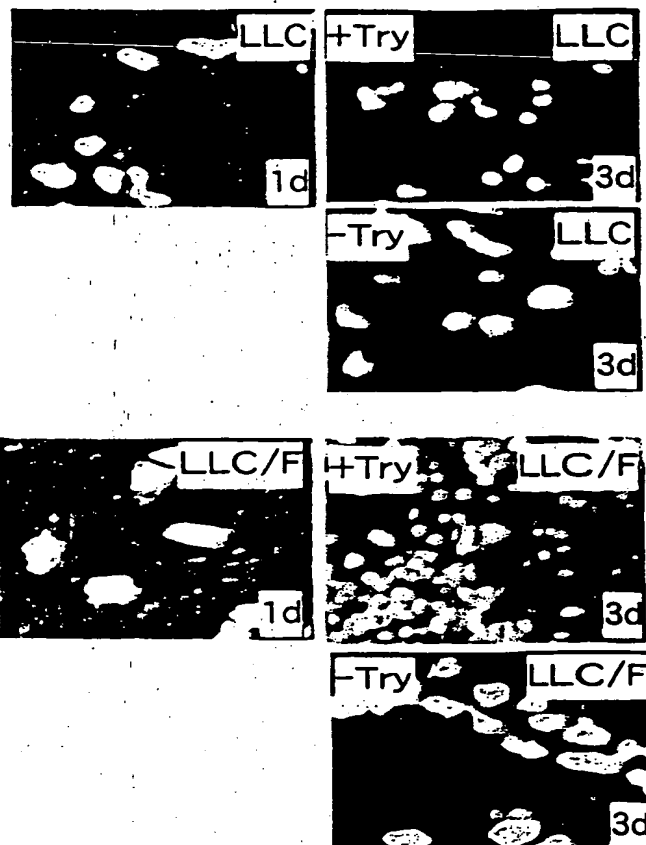
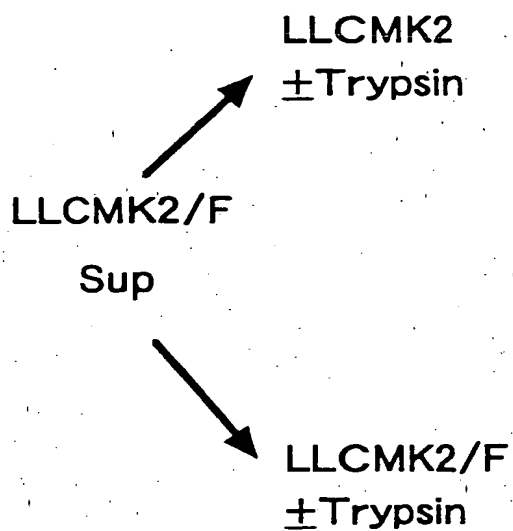


LLCMK2 supによる感染



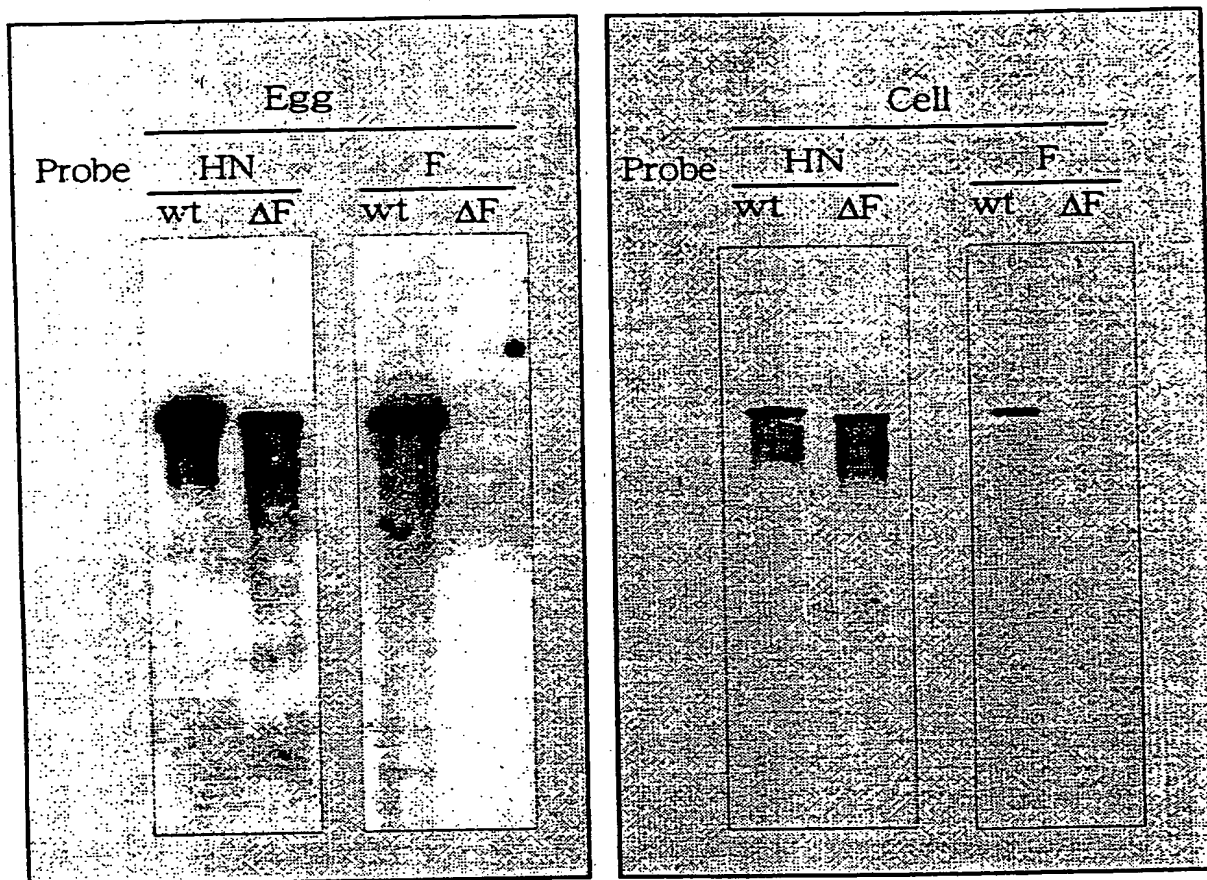
8 / 6 2

8



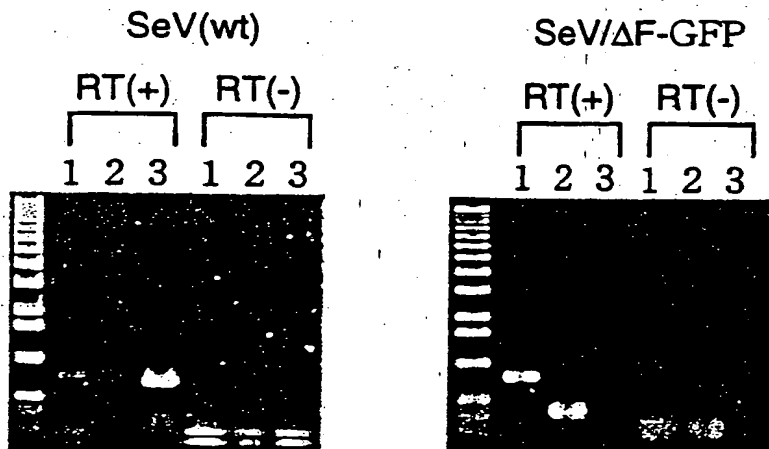
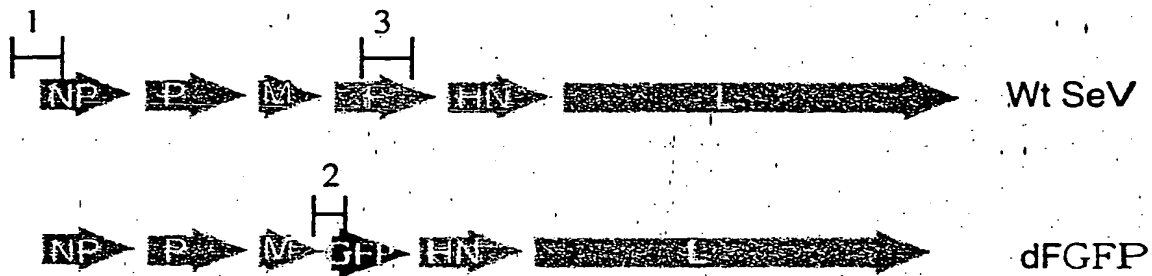
10/62

10



1.1 / 6.2

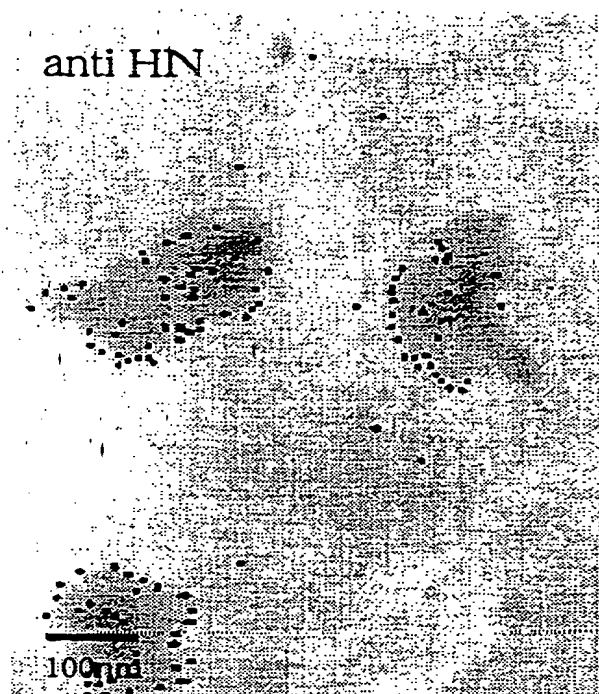
図 1.1



- 1: +18-NP、+18Not.Iサイトの存在の確認
- 2: M-GFP、GFP遺伝子がF遺伝子欠損部位の存在の確認
- 3: F gene、F遺伝子の存在の確認

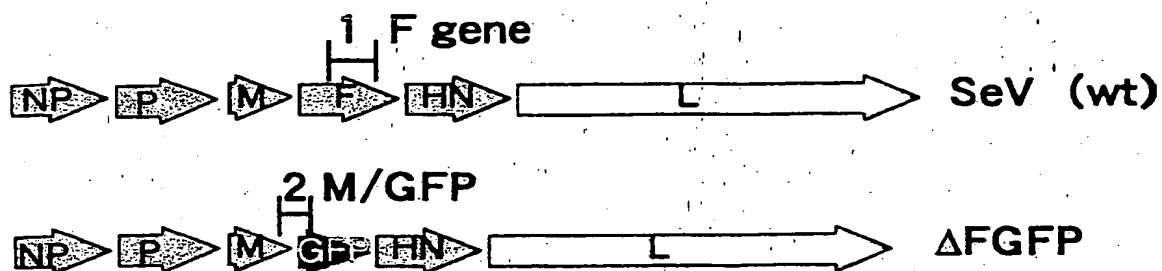
12 / 62

12



13/62

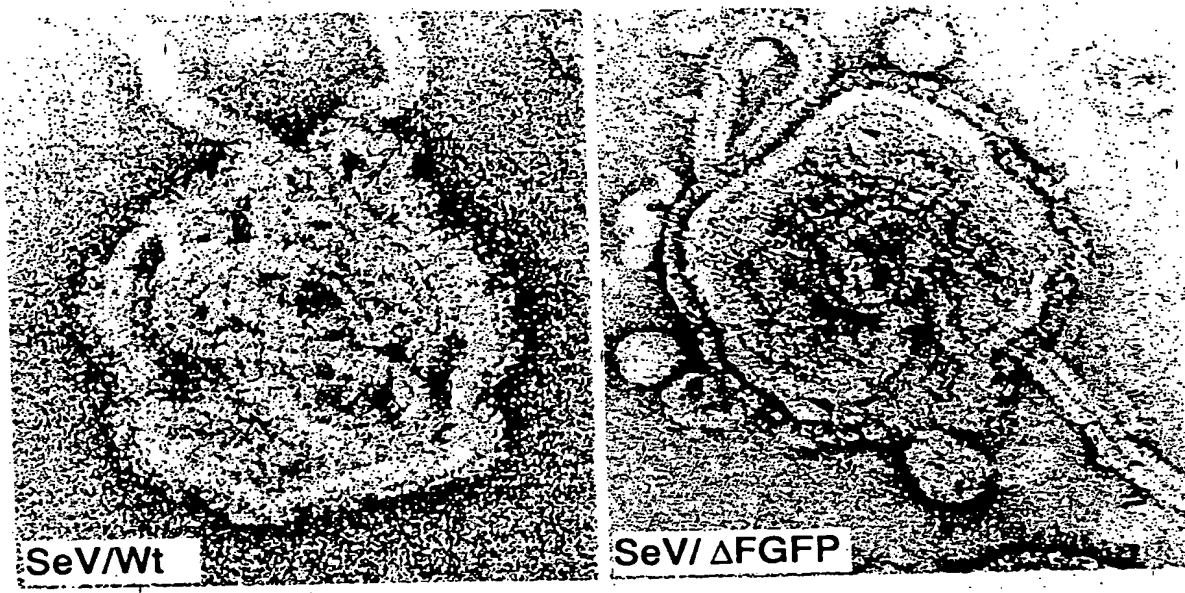
FIG 13



Primer Set	$\Delta$ FGFP	F/ $\Delta$ FGFP	GFP/SeV	SeV (wt)
1	-	+	+	+
2	+	+	-	-

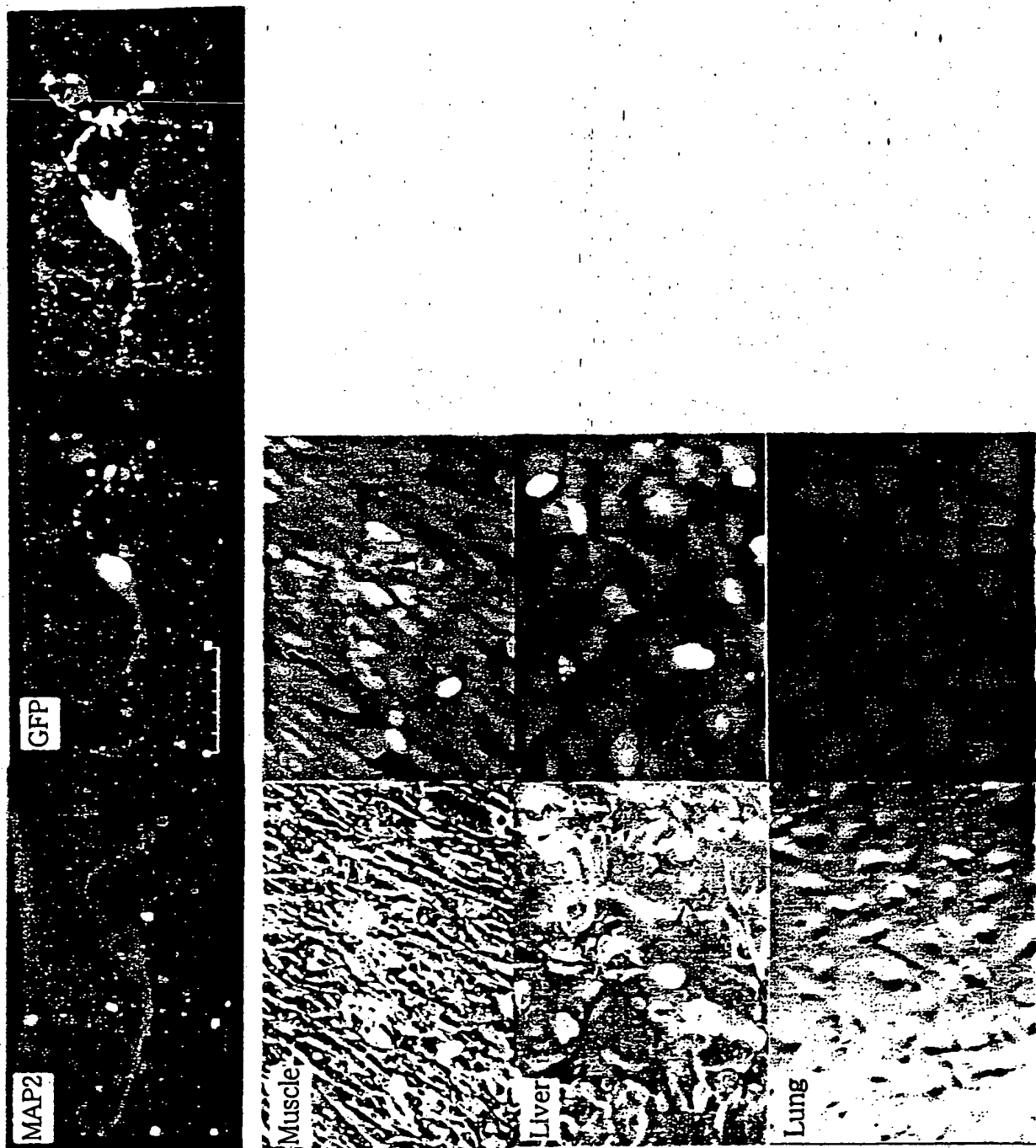
14/62

図 14



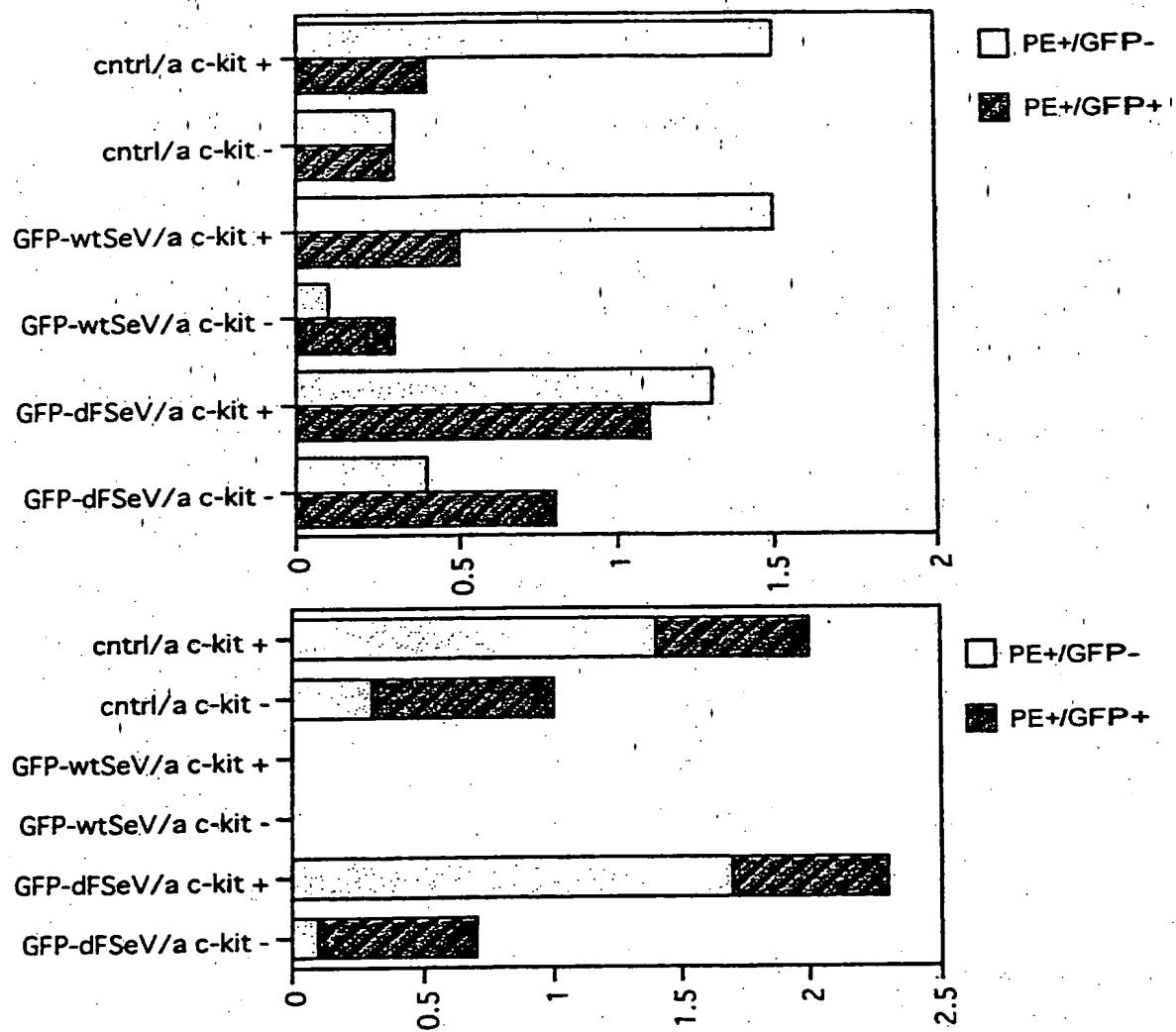
15 / 62

図 15



1.6 / 6 2

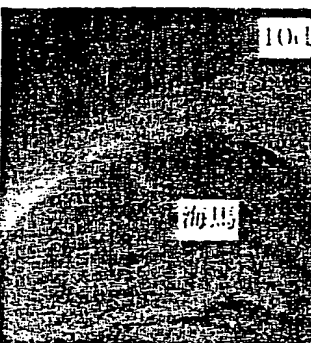
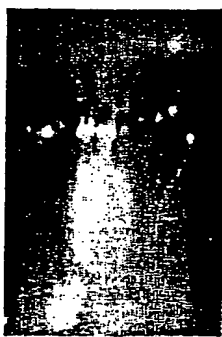
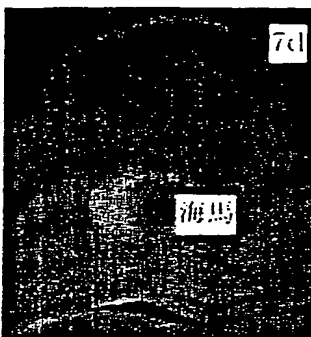
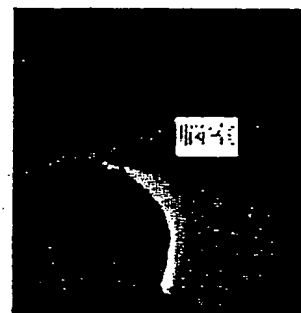
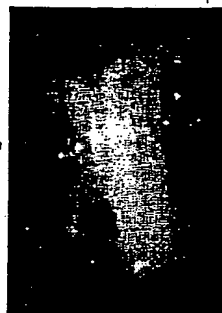
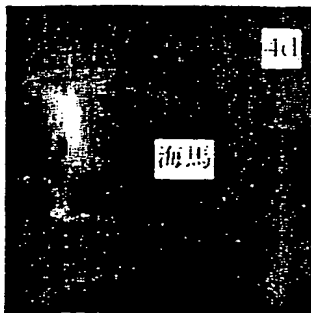
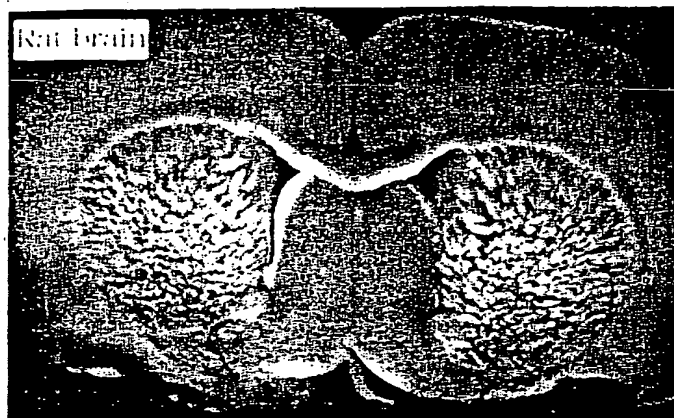
16



17 / 62

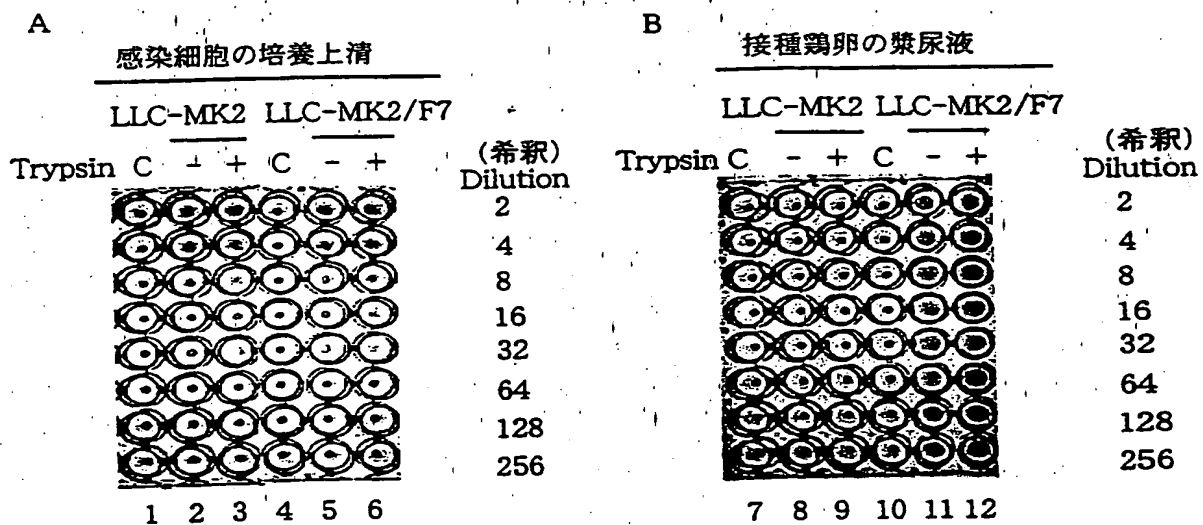
図 17

in vivo



1.8 / 6 2

図 18



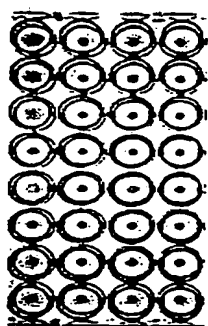
19/62

図 19

C

接種鶏卵の漿尿液 (P2)

Dilution(希釈)

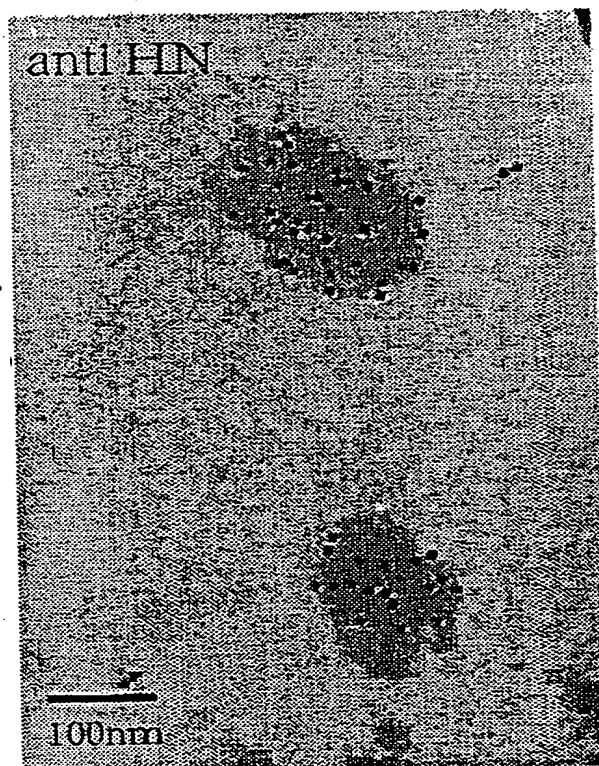
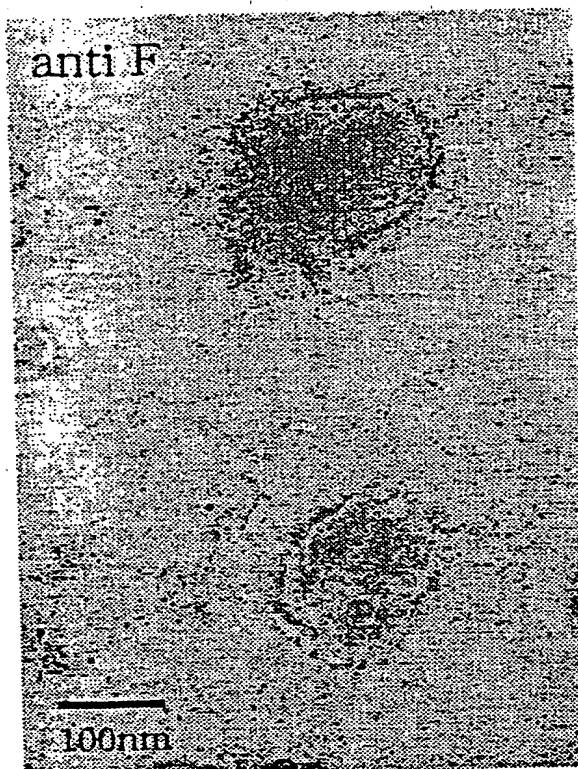


- |     |                                      |
|-----|--------------------------------------|
| 2   | 13: 陽性対象群、F発現細胞の培養上清(lane 6)接種した     |
| 4   | 14: 陰性対象群、PBS                        |
| 8   |                                      |
| 16  | 15: HA陽性の漿尿液(lane 11)発育鶏卵に再接種した (P2) |
| 32  |                                      |
| 64  | 16: HA陽性の漿尿液(lane 12)発育鶏卵に再接種した (P2) |
| 128 |                                      |
| 256 |                                      |

13 14 15 16

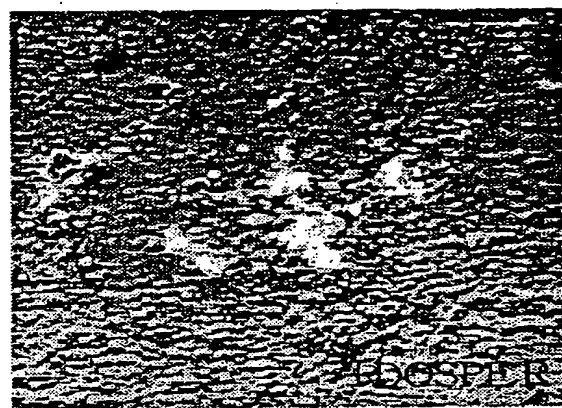
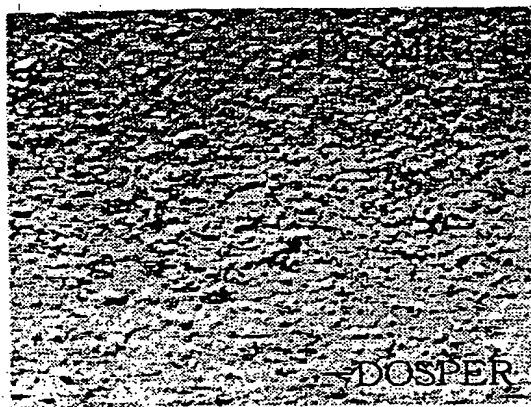
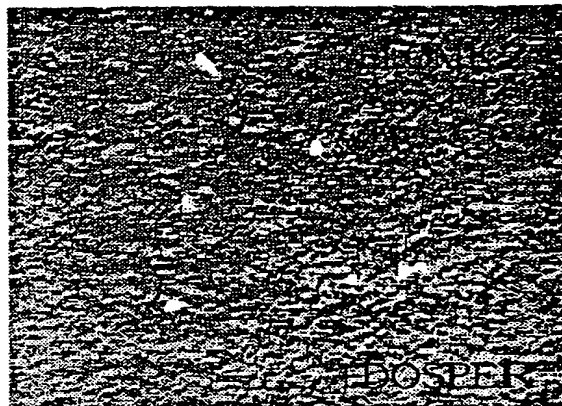
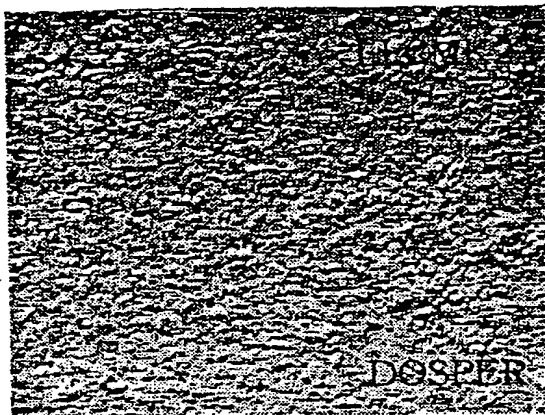
20/62

20



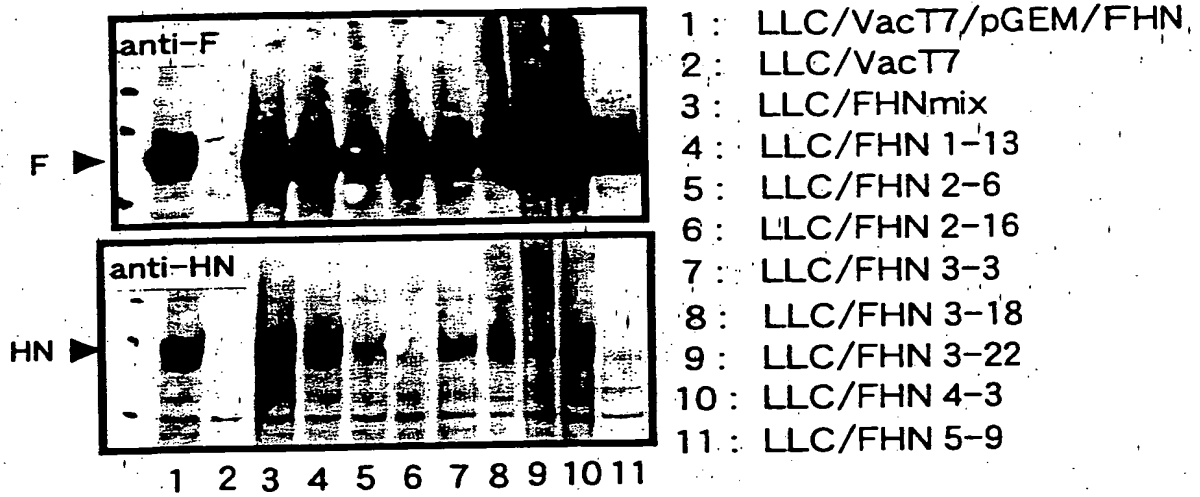
21/62

21



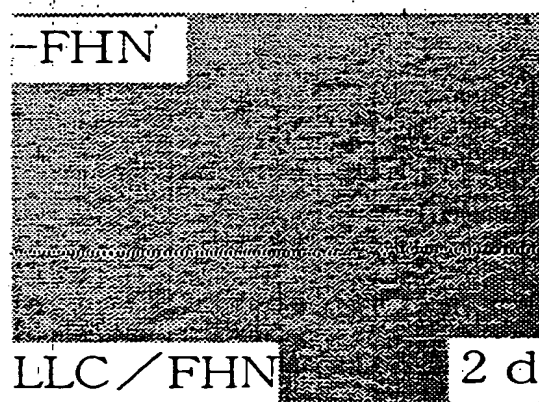
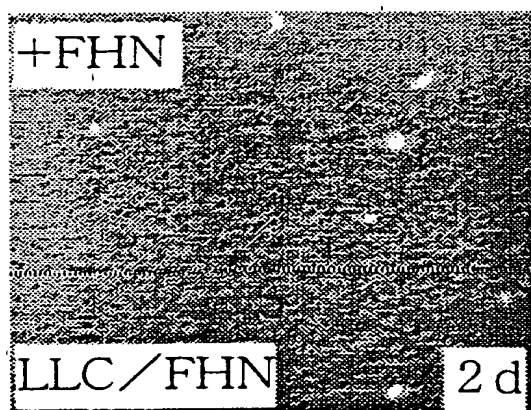
22 / 62

22

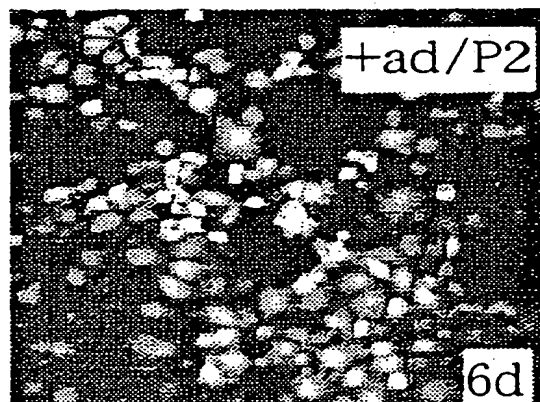
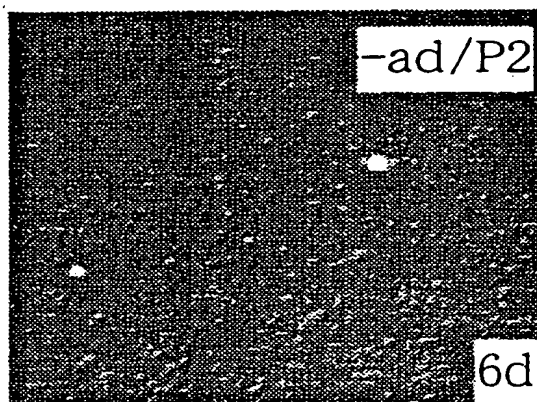


23/62

図 23

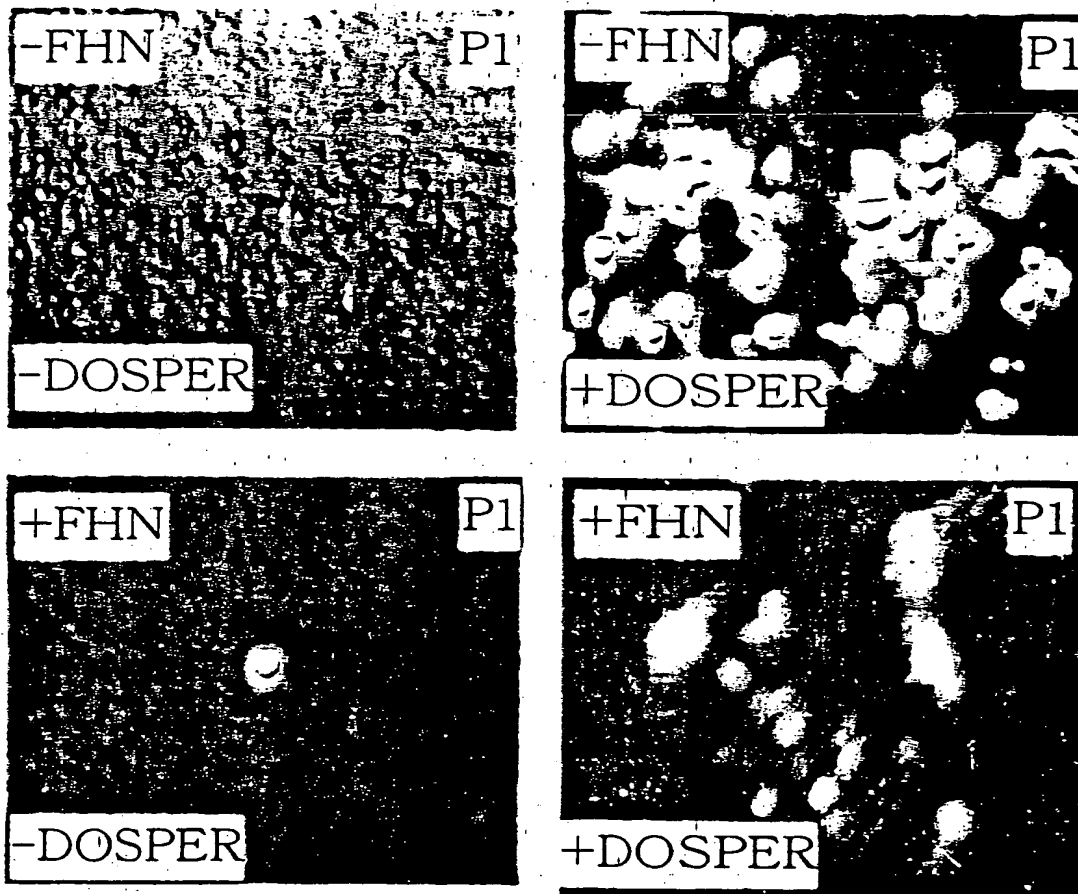


P1 sup重層

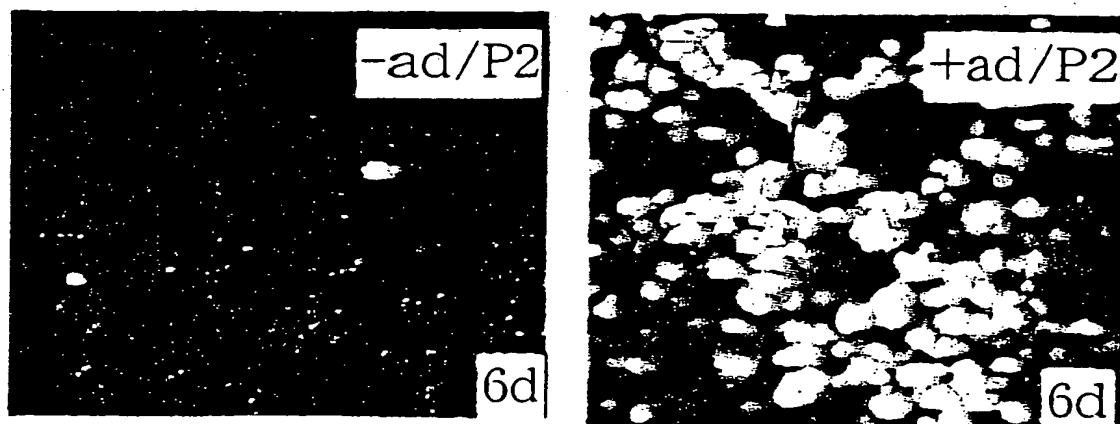


24 / 62

図 24

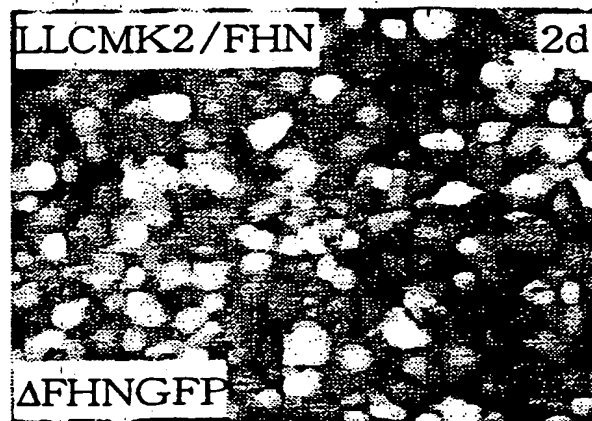
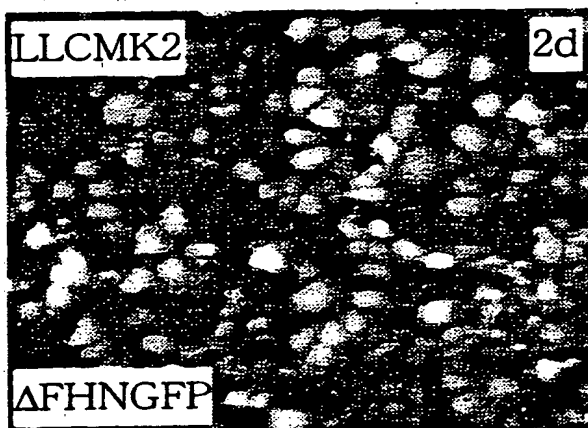


P1 sup重層



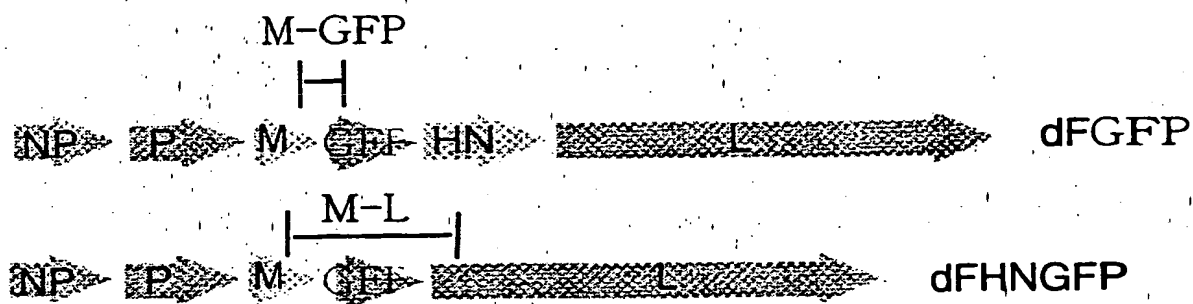
25 / 62

25

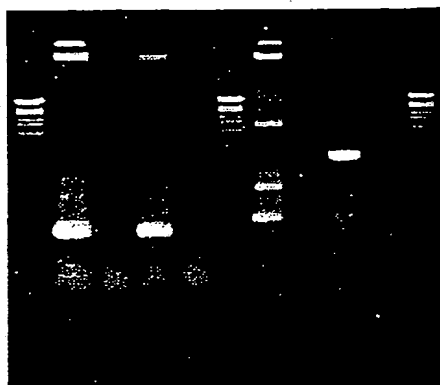


2.6 / 6.2

26



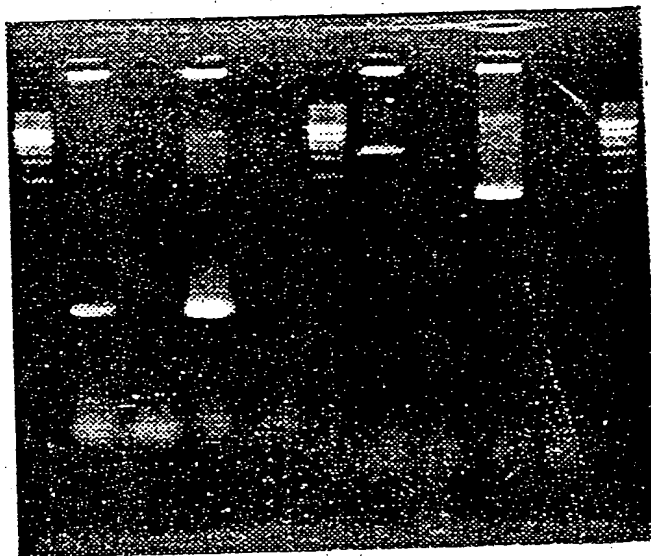
	M-GFP		M-L	
	$\Delta F$	$\Delta FHN$	$\Delta F$	$\Delta FHN$
RT	+	-	+	-
	-	+	-	+



27 / 62

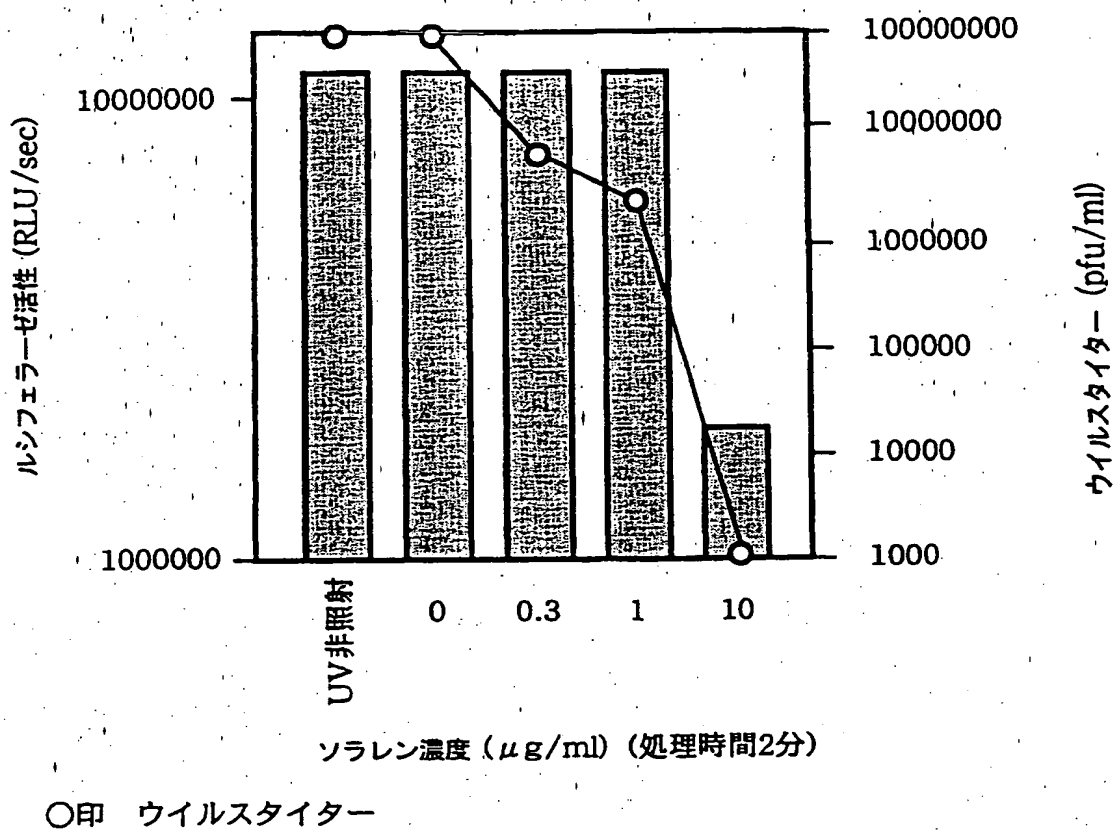
図 27

M-GFP				M-L				
$\Delta F$		$\Delta FHN$		$\Delta F$		$\Delta FHN$		
RT	+	-	+	-	+	-	+	-



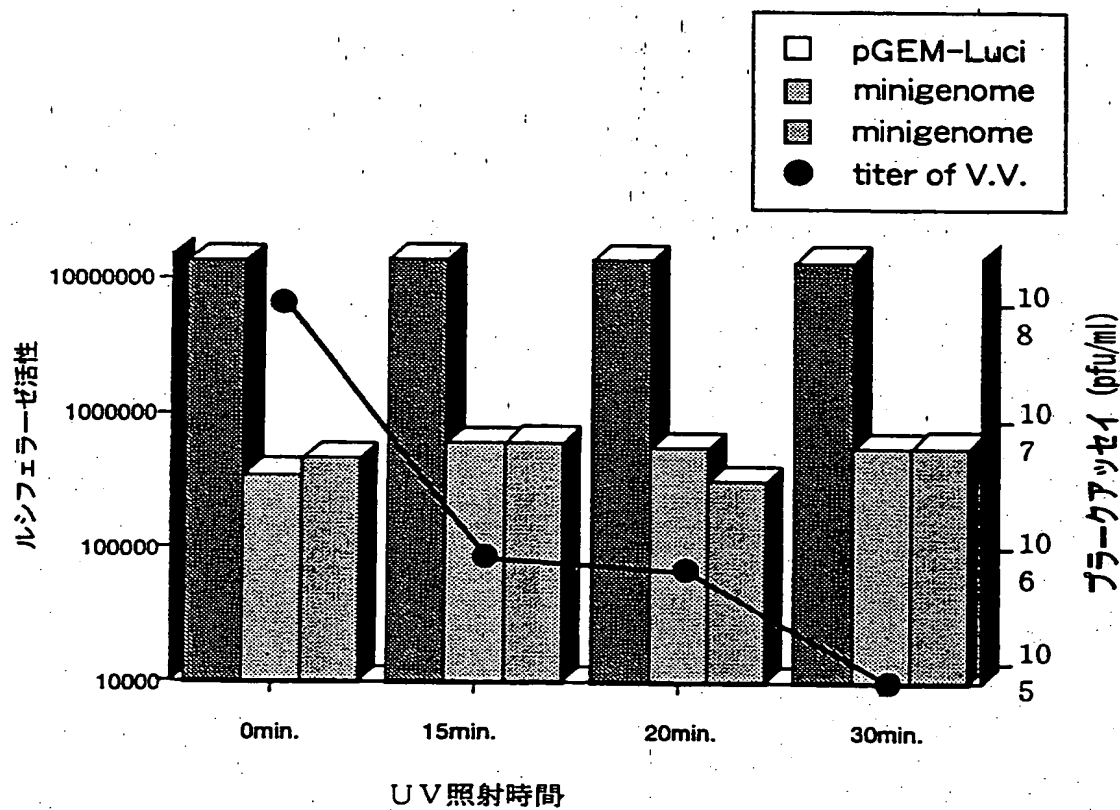
28 / 62

図 28



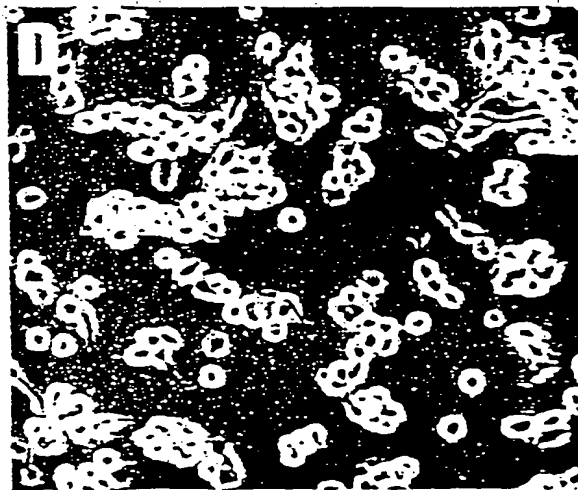
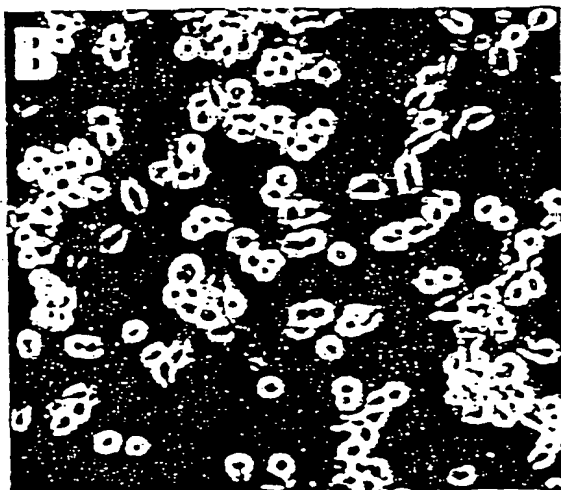
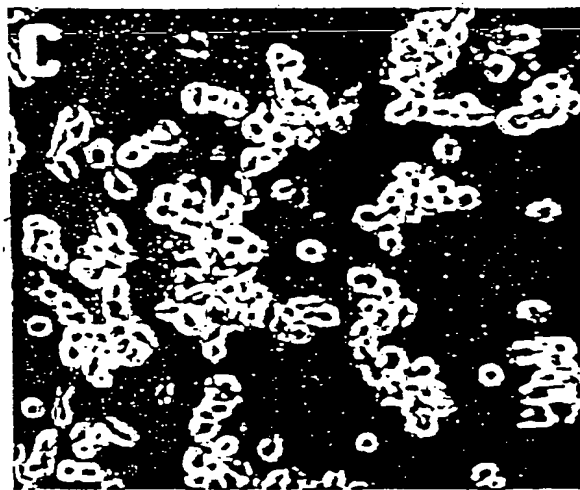
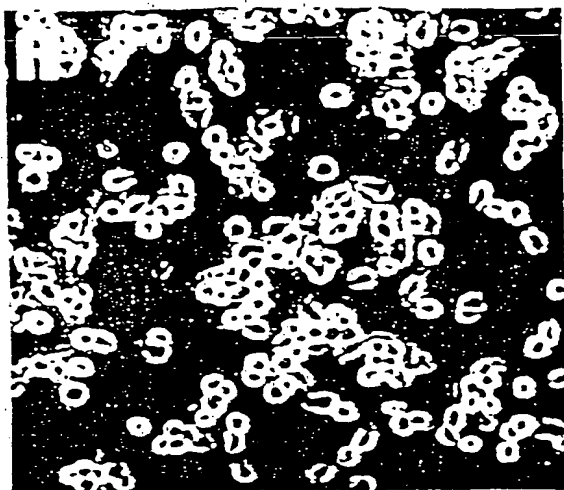
29/62

図 29



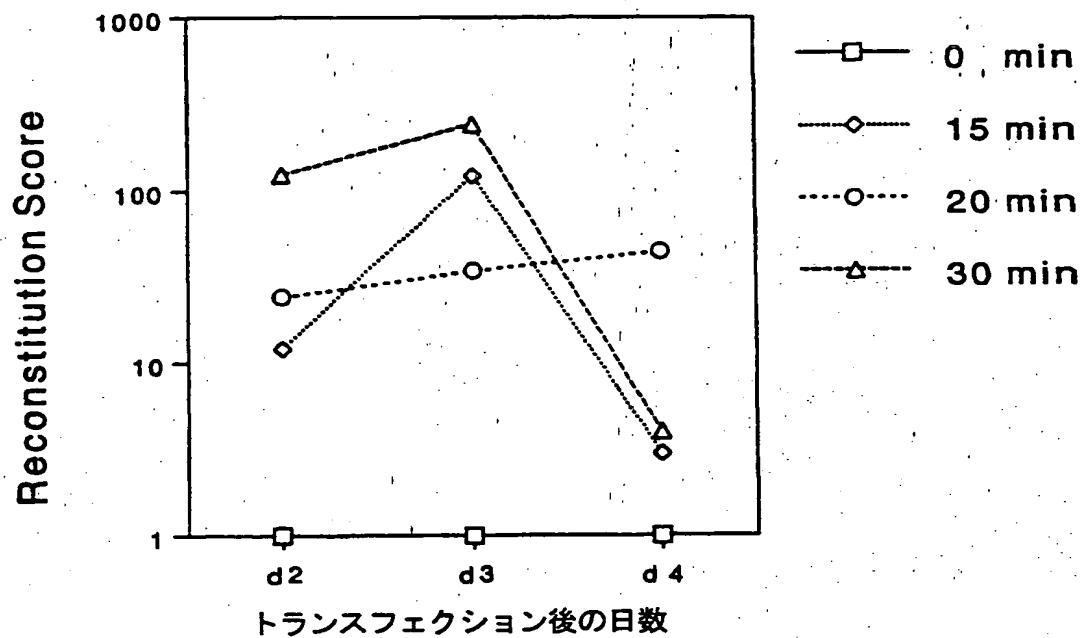
30 / 62

図 30



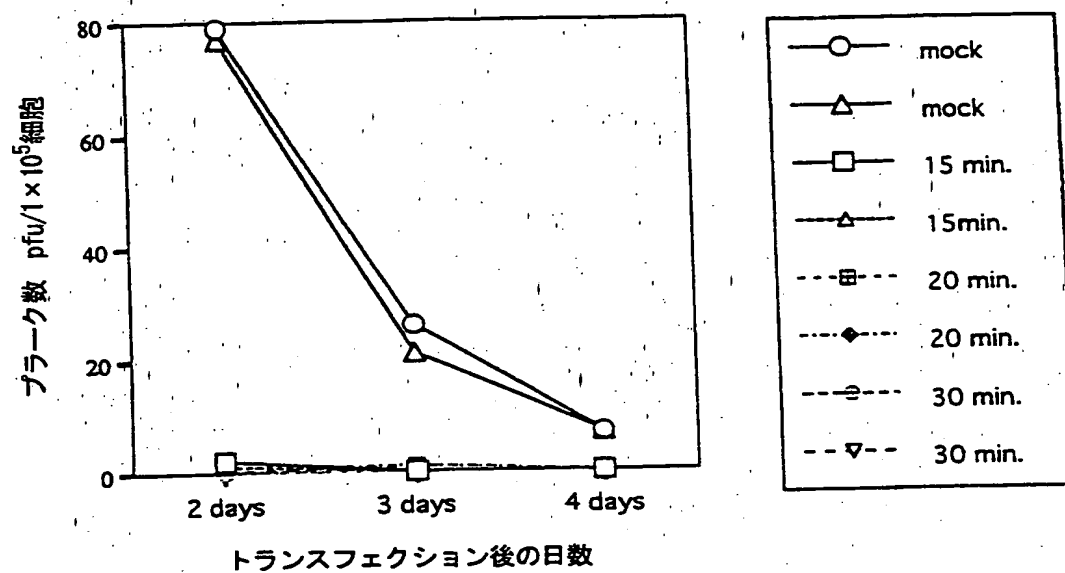
31/62

図 31



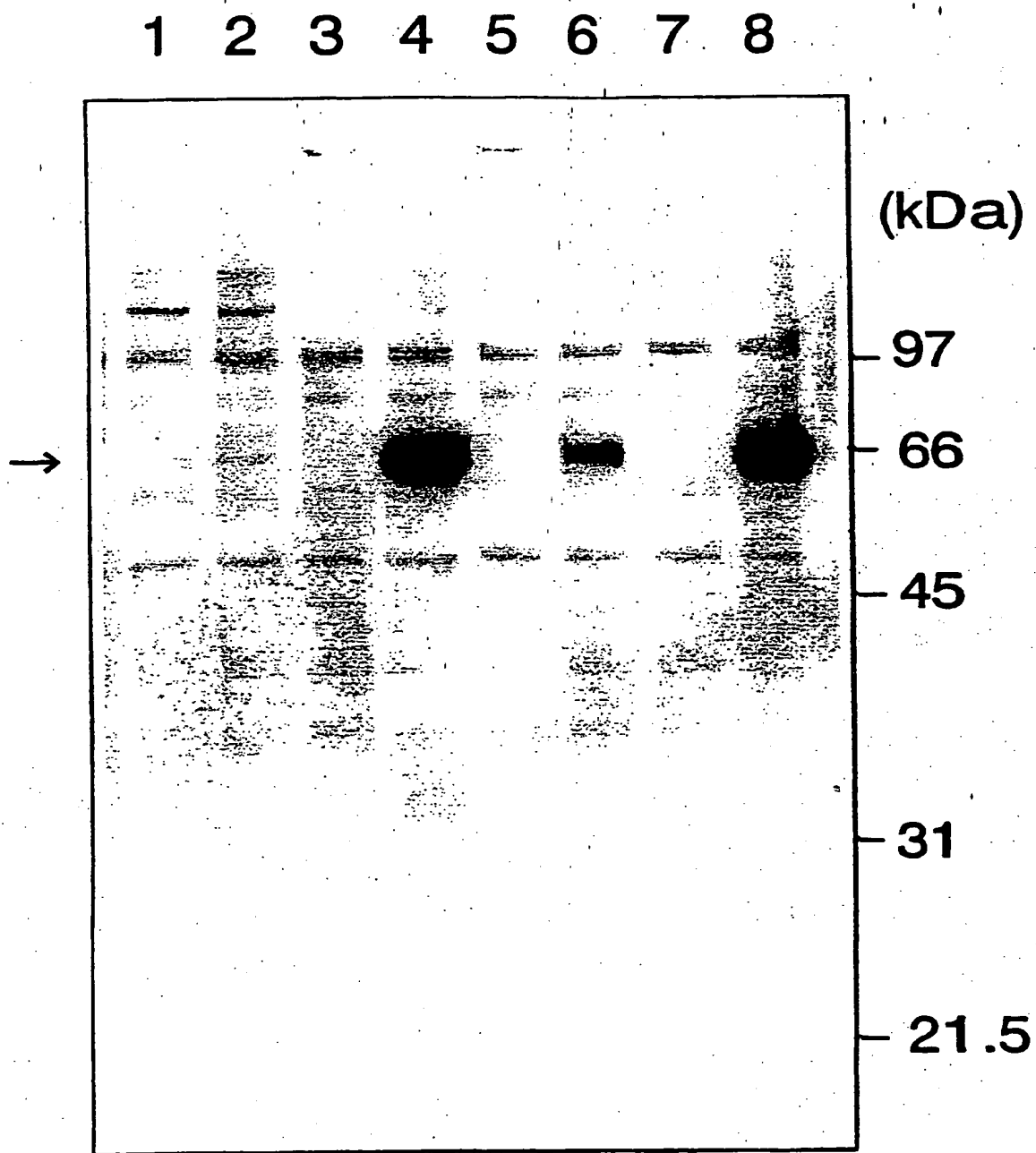
32 / 62

図 3 2



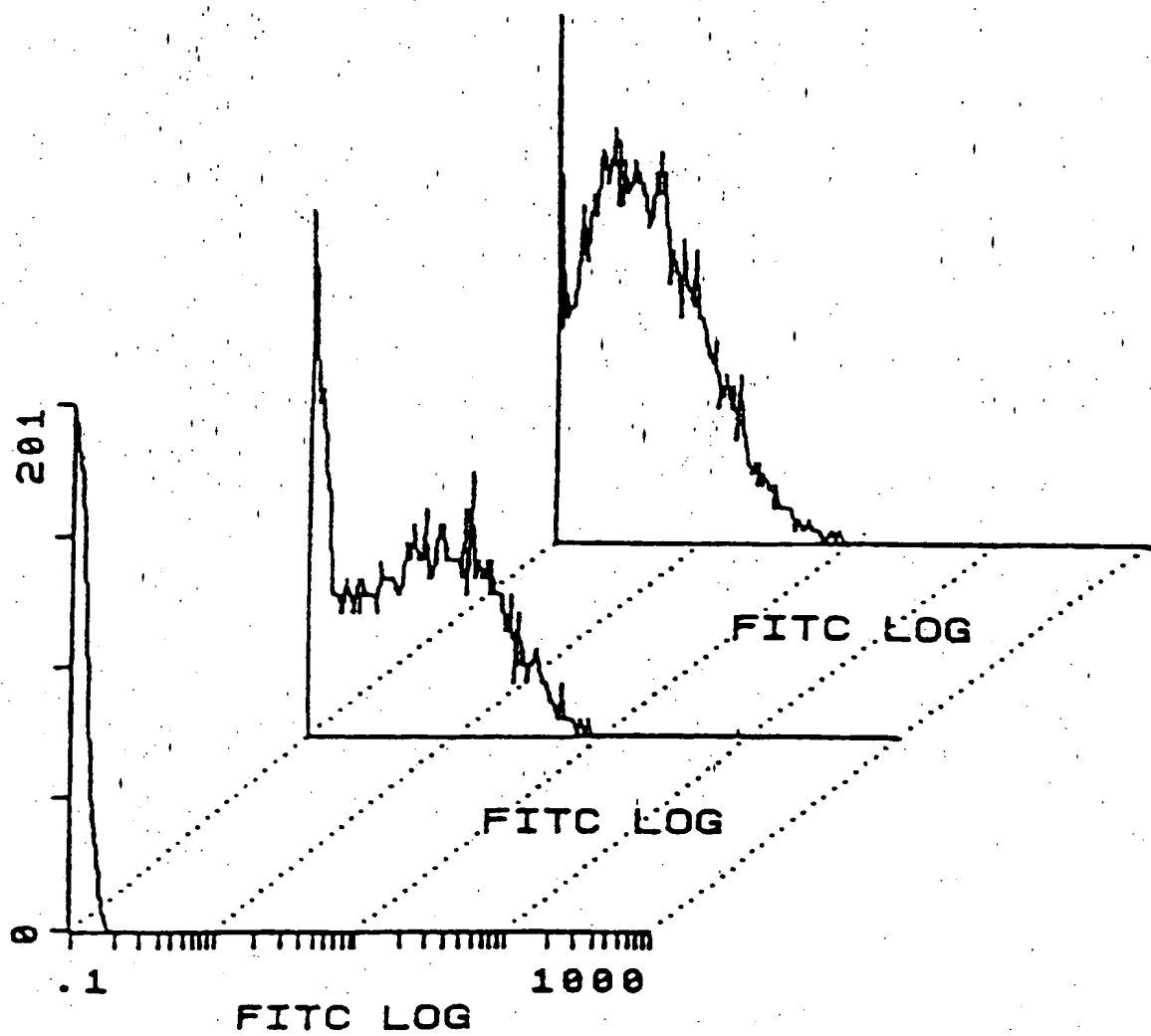
33 / 62

33



34 / 62

34



35 / 62

図 35

VSV-G 誘導

MOI

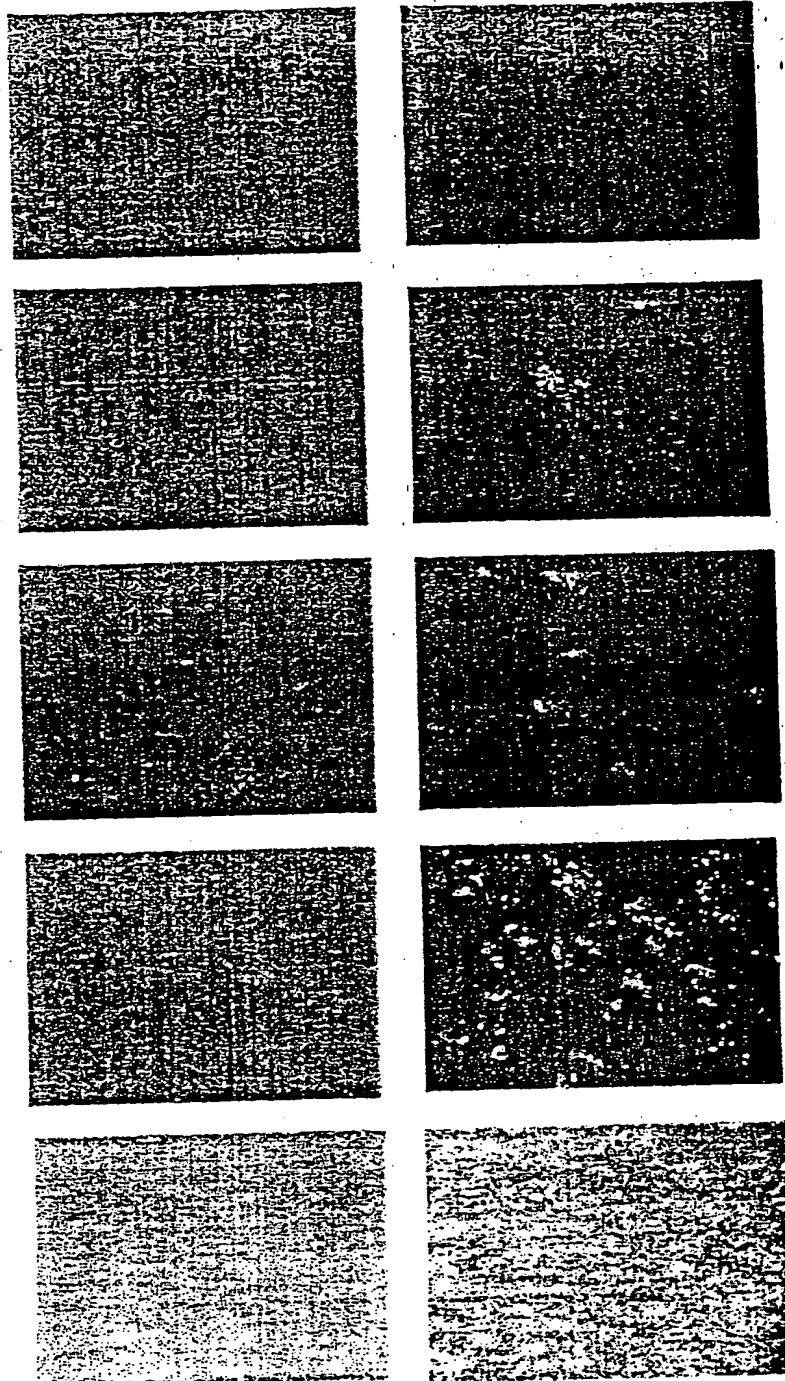
0

1.25

2.5

5

10



P3 ウイルス液 : 感染 7 ~ 8 日目培養上清

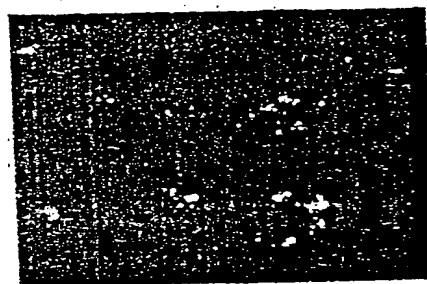
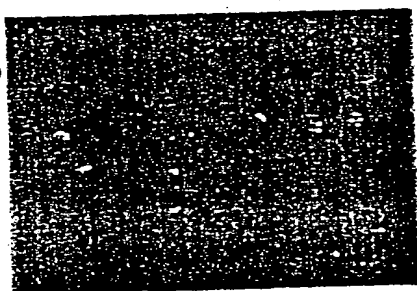
3.6 / 6.2

図 3.6

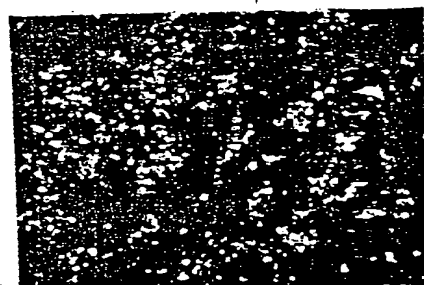
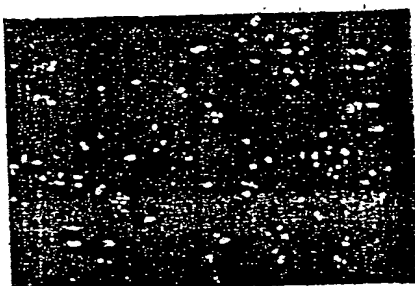
# VSV-G 誘導

培養上清回収

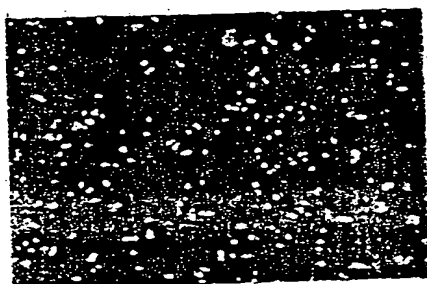
1 ~ 5 日



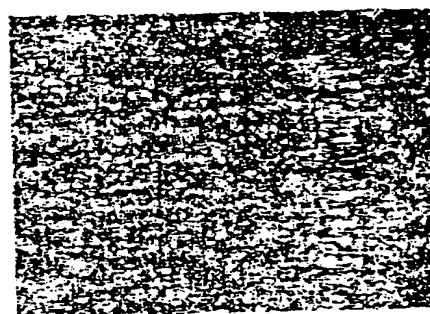
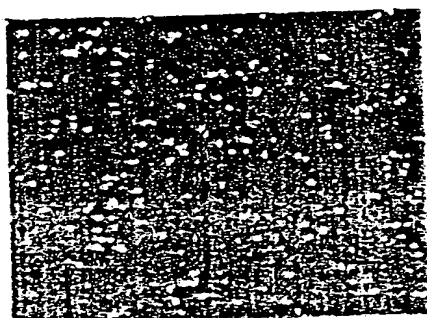
5 ~ 6 日



6 ~ 7 日



7 ~ 8 日



37 / 62

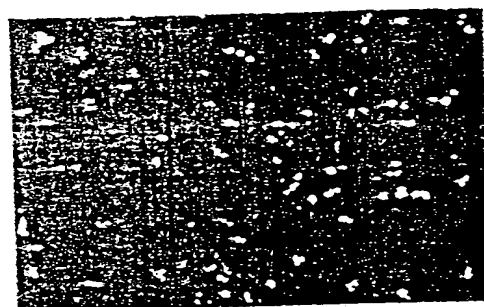
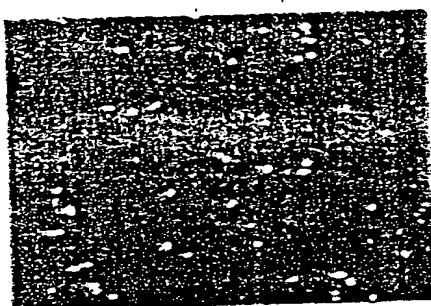
図 37

Envelope

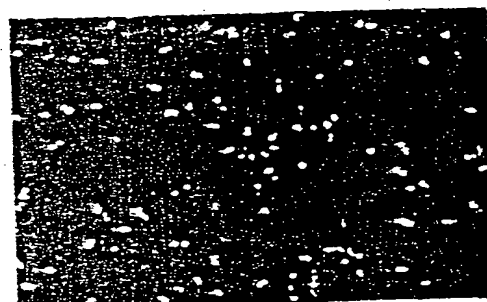
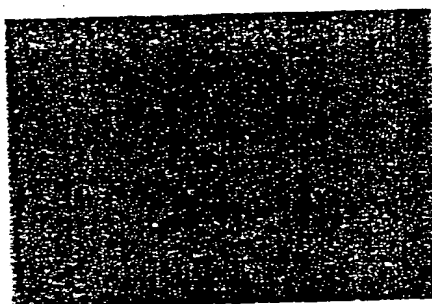
抗体

VSV-G

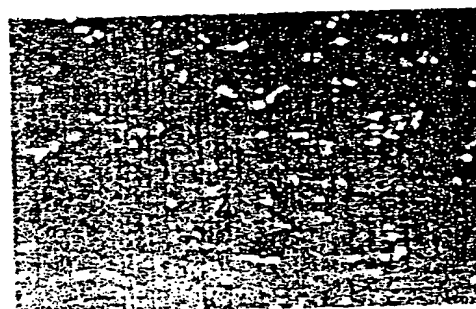
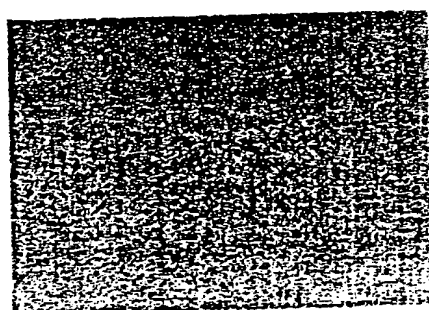
F, HN



1/2



1/20

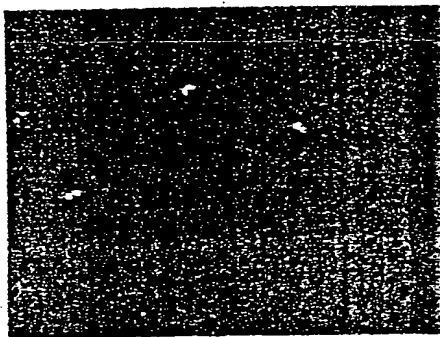


genome: SeV(+18)/ΔF:GFP

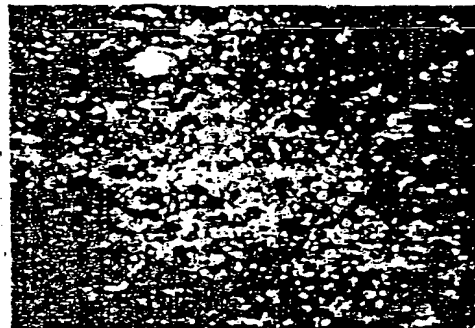
38 / 62

☒ 38

- VSV-G

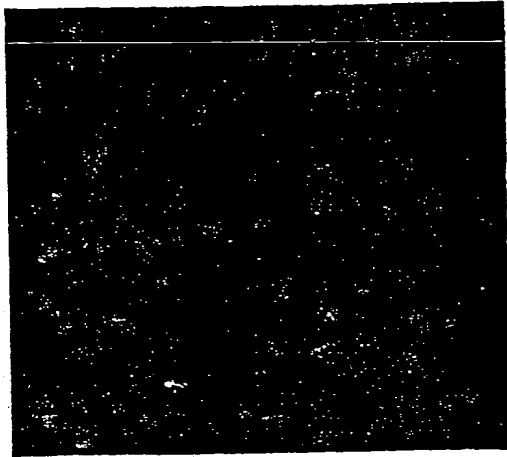


+ VSV-G

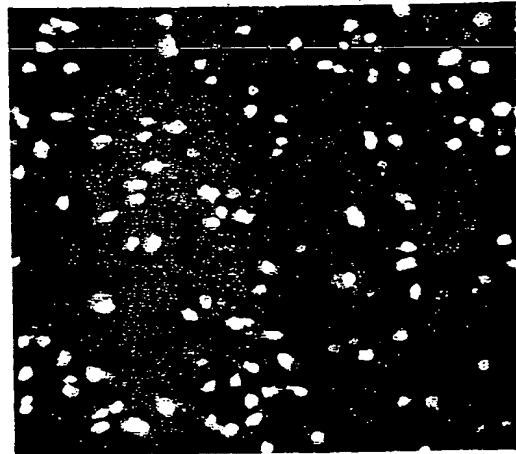


40 / 62

図 40



抗 SeV 抗体および抗ウサギ蛍光標識  
二次抗体を用いた CIU 測定

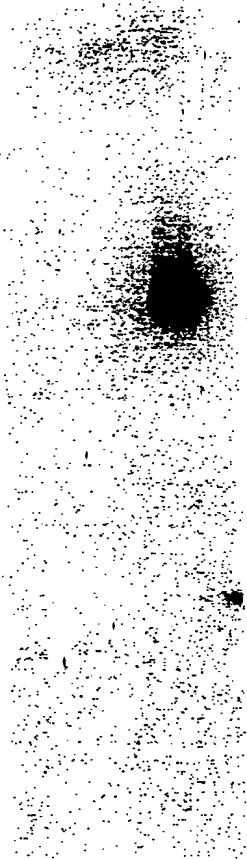


GFP 発現細胞による CIU 測定  
(対照)

39 / 62

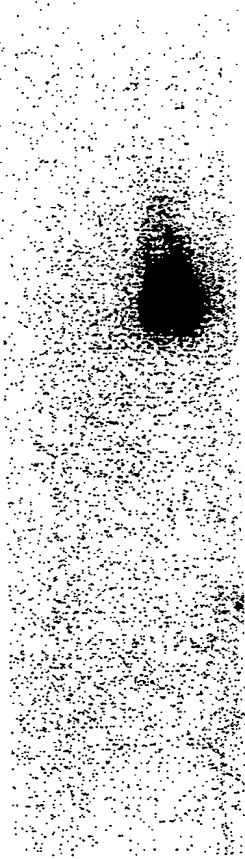
☒ 39

1 2 3



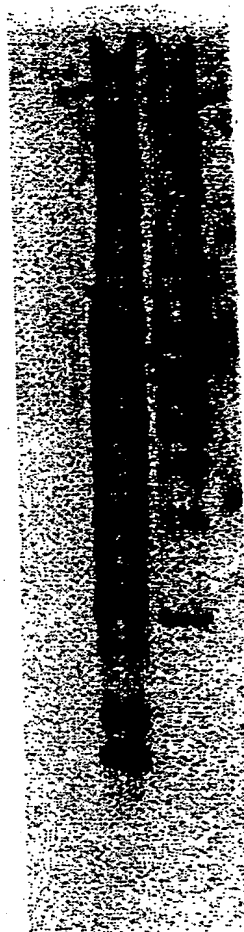
anti-F

1 2 3



anti-HN

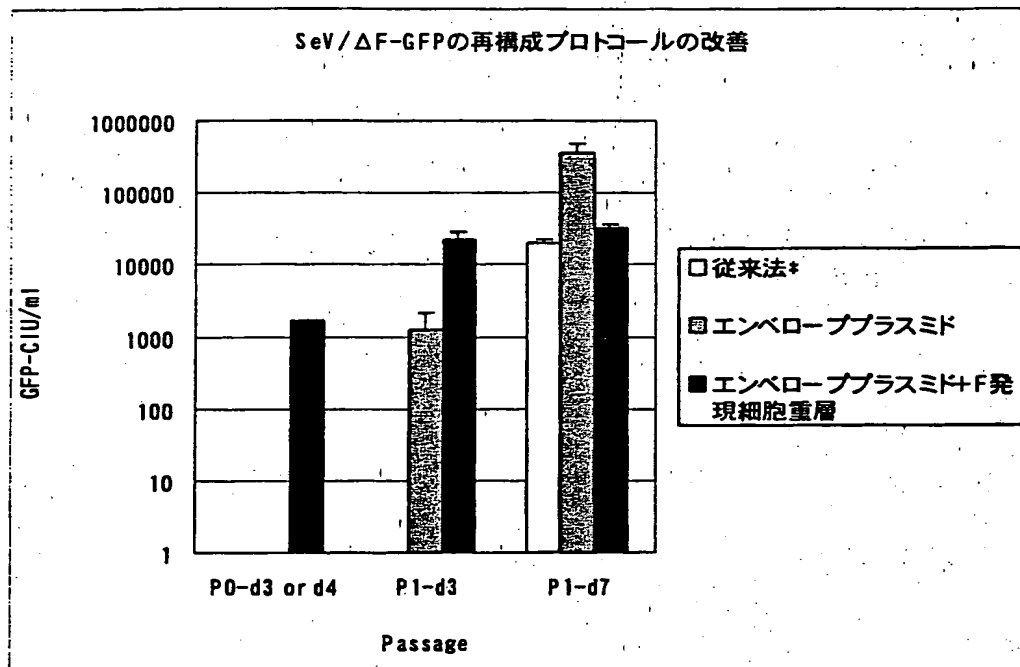
1 2 3



anti-SeV

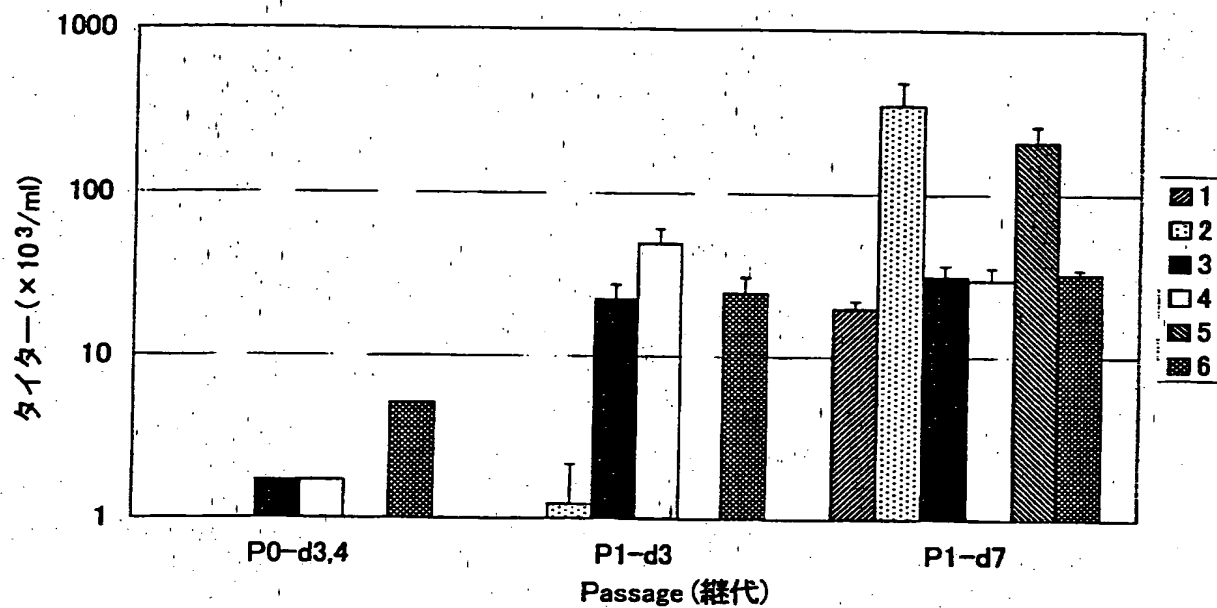
41 / 62

図 4 1



43 / 62

図 4 3

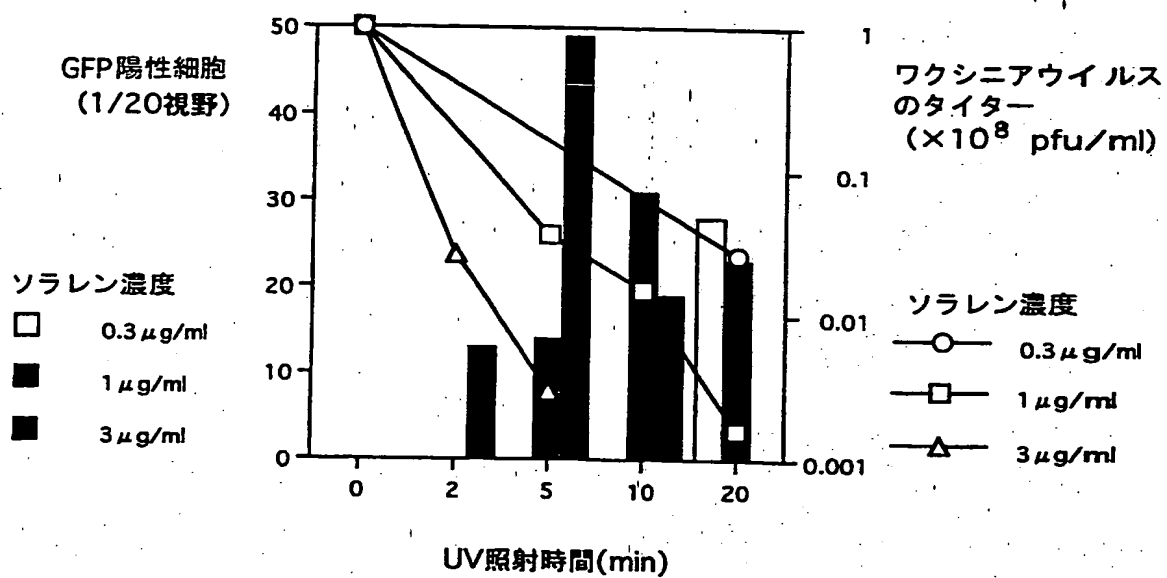


	V.V	V.V Lot.No	pGEM-FHN	O.L	P1-Tf
1	vTF7-3(3,5)φ35mm*	990913	-	-	Dosper
2	vTF7-3(3,5)φ35mm*	990913	○	-	O.L
3	vTF7-3(3,5)φ35mm*	990913	○	○	O.L
4	vTF7-3(3,5)φ35mm*	000202	○	○	O.L
5	vTF7-3(0,0)	990913	○	○	O.L
6	vTF7-3(3,5)φ100mm*	000202	○	○	O.L

\*: PLWUV処理に使用したdishサイズ  
 () 内: (ソラレン濃度μg/ml, UV時間min)

42 / 62

図 4 2



44/62

44

Exp. No.

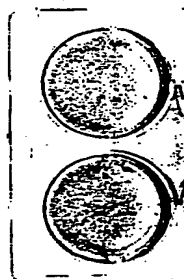
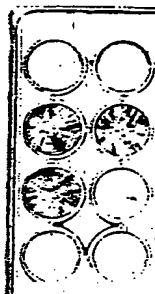
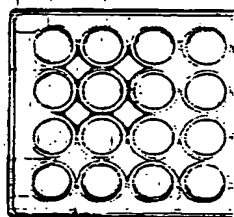
P1

P2

P3

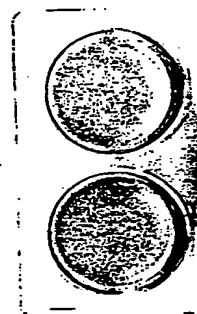
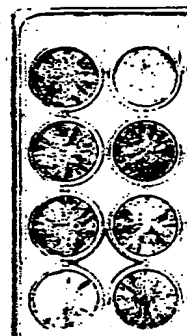
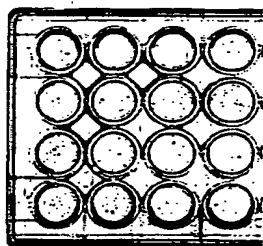
P4

1



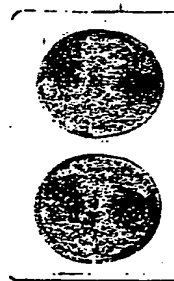
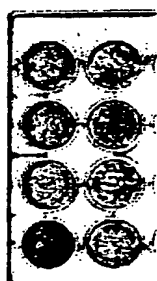
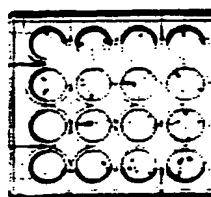
N. T.

2



N. T.

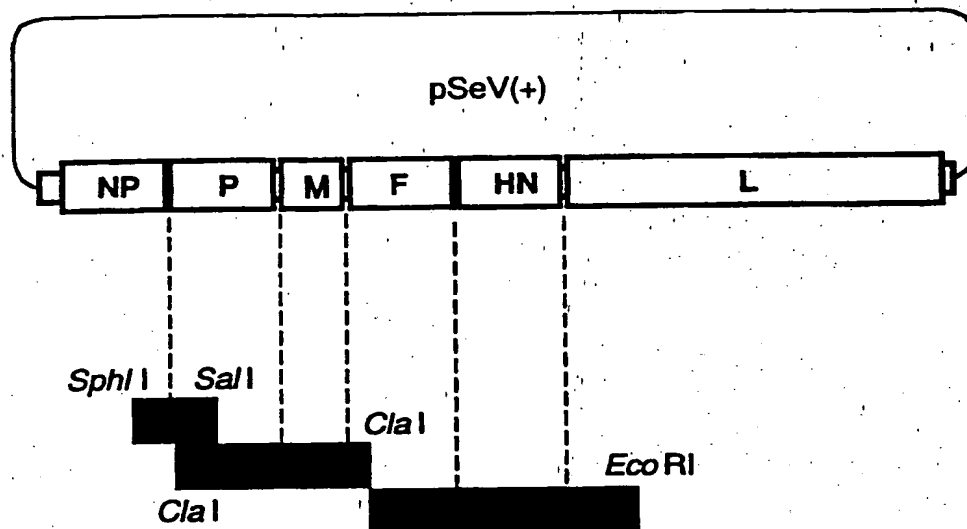
3



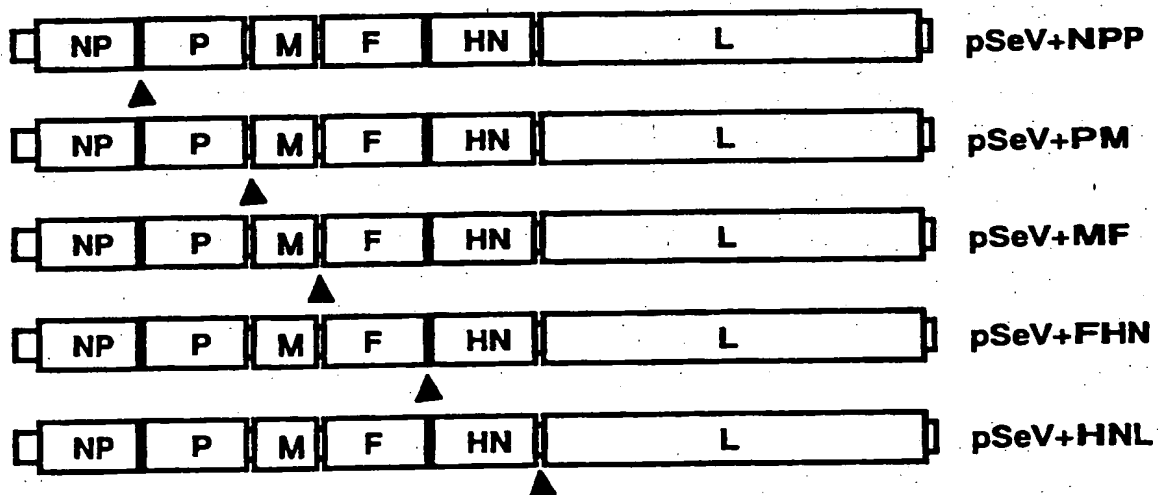
45 / 62

図 45

(A)



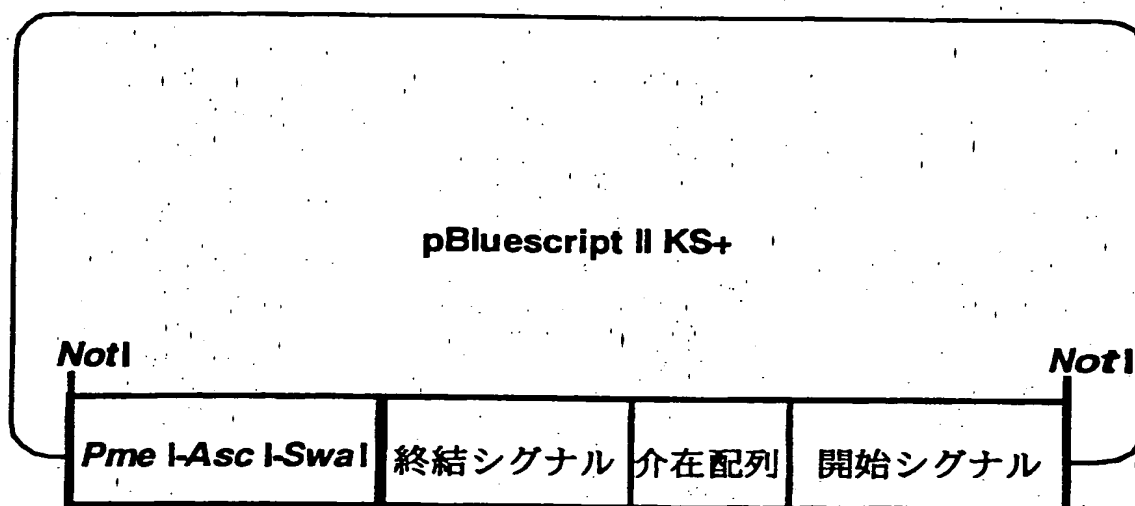
(B)



▲ 新しい Not I 部位

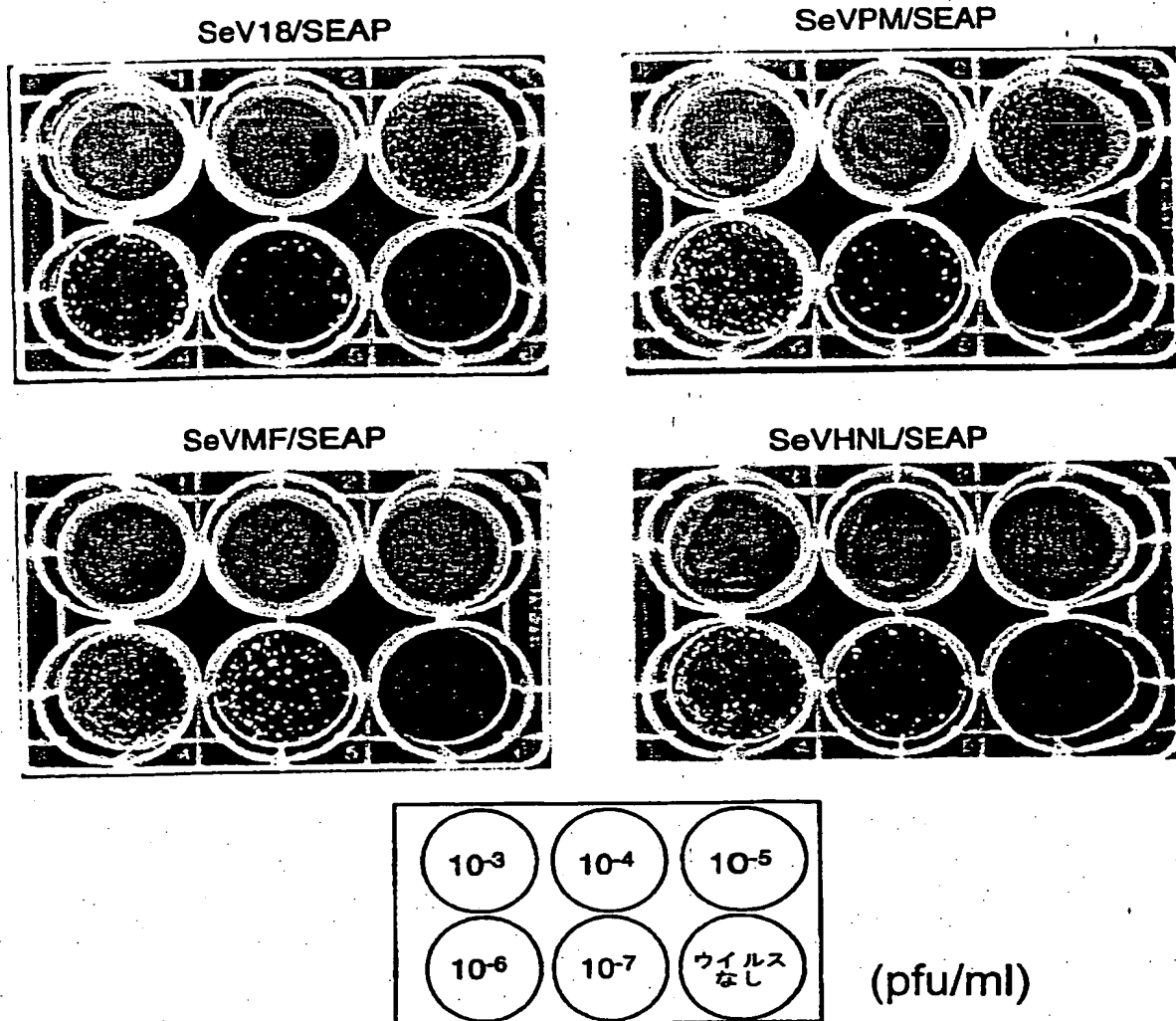
46 / 62

図 46



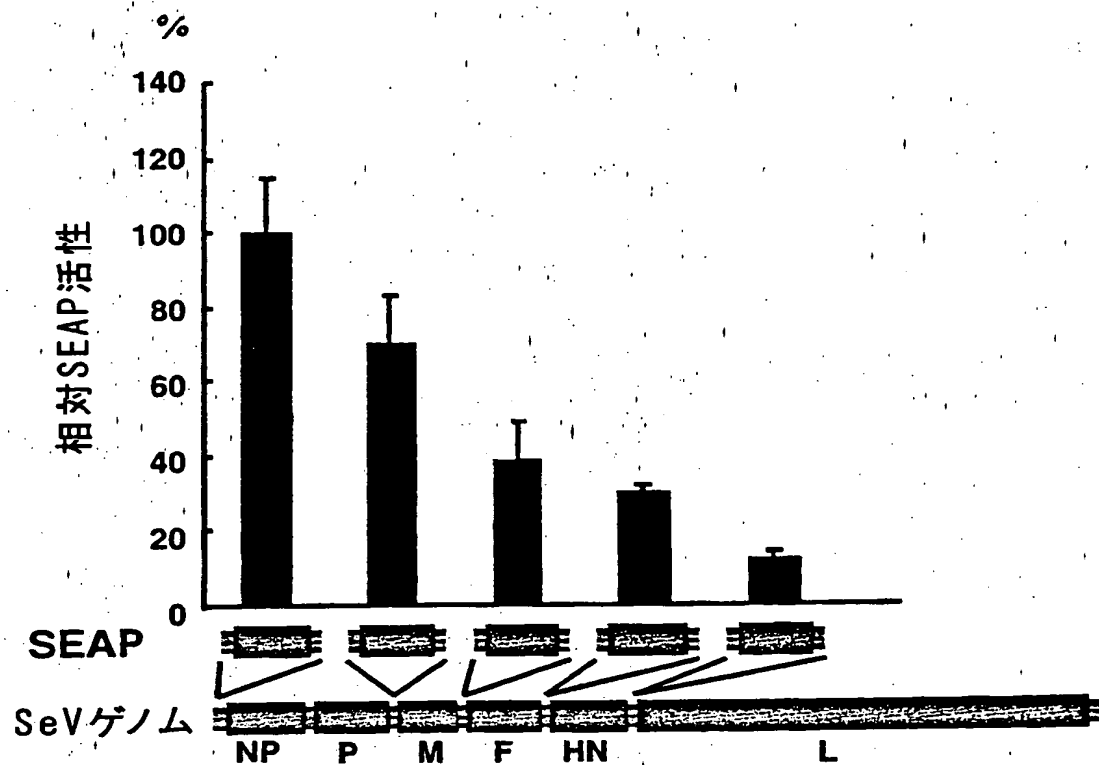
47 / 62

図 47



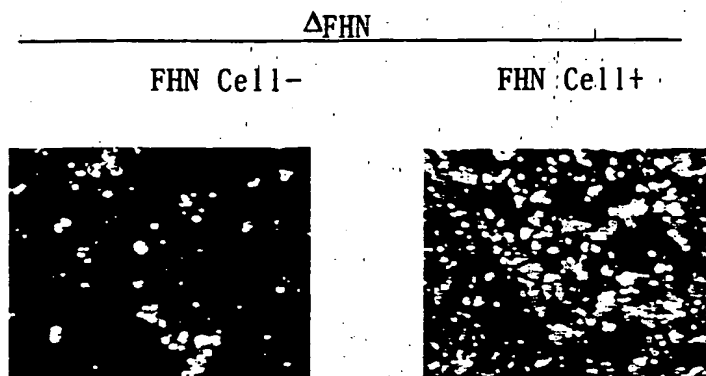
48 / 62

図 48



49 / 62

図 49

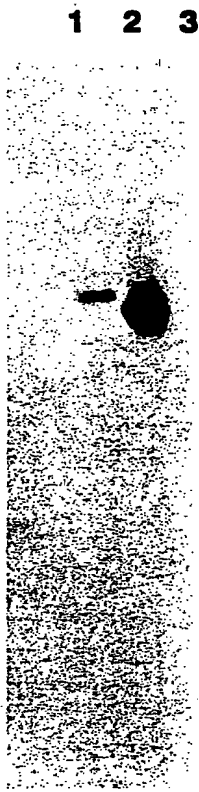


50 / 62

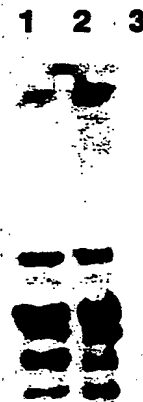
☒ 50



anti-F



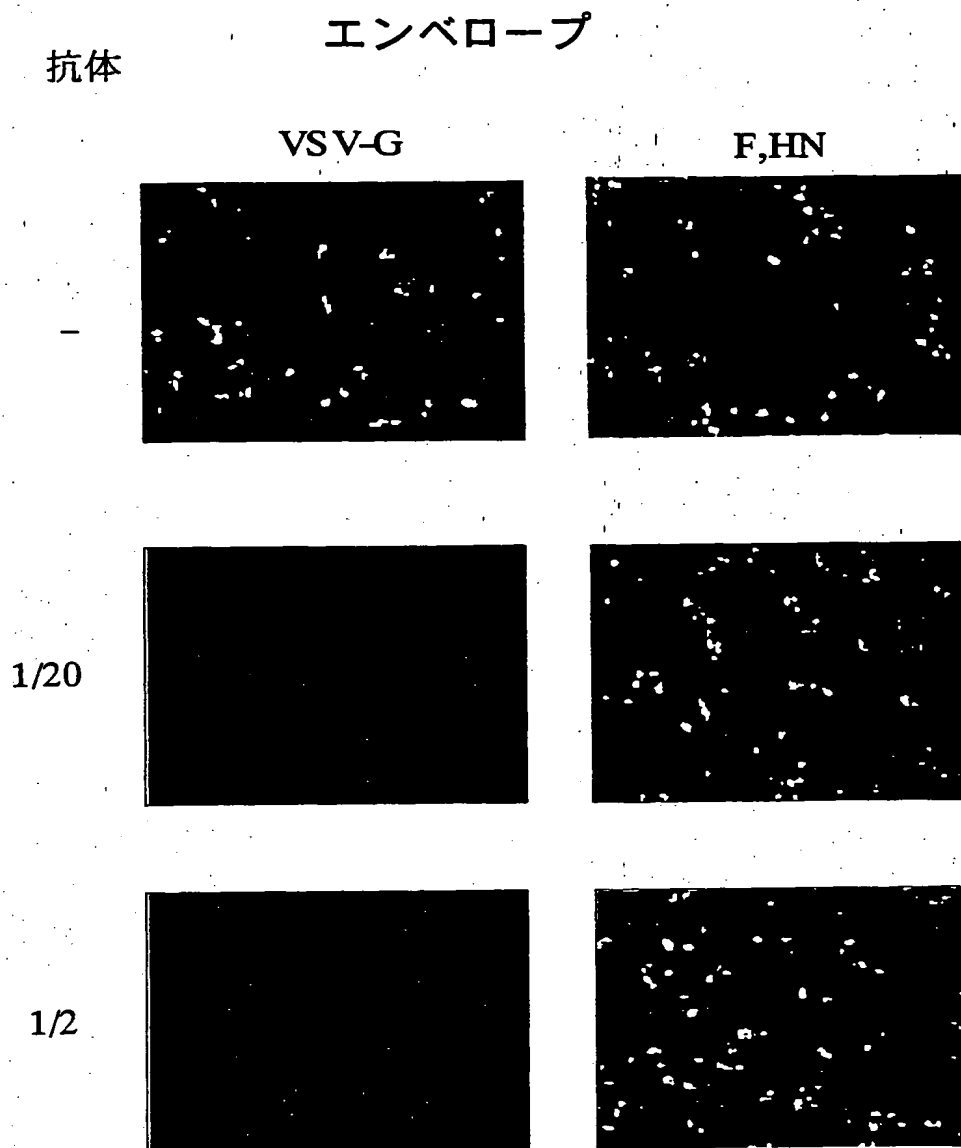
anti-HN



anti-SeV

51 / 62

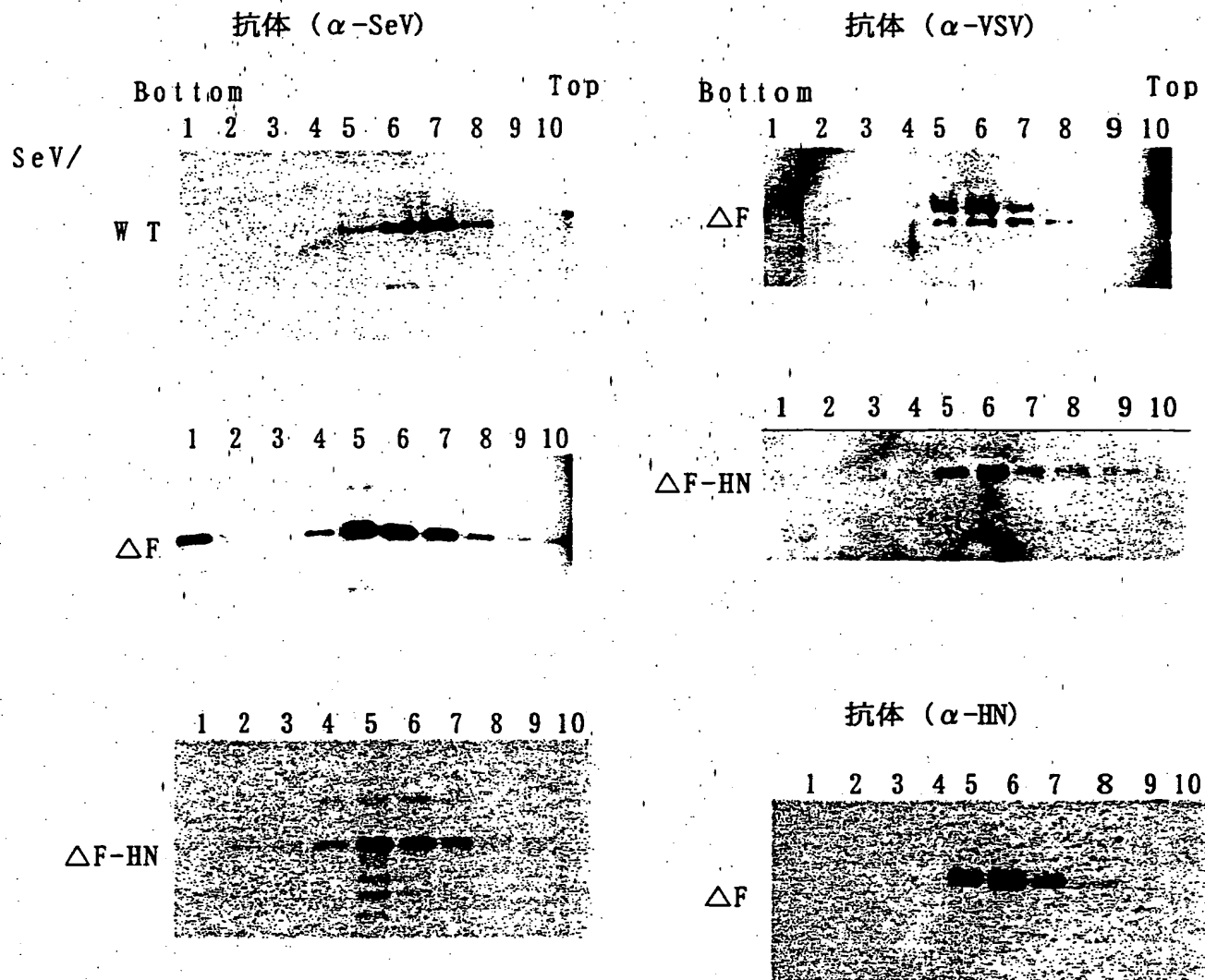
図 5 1



ゲノム: SeV(+18)/ΔF-HN:GFP

52/62

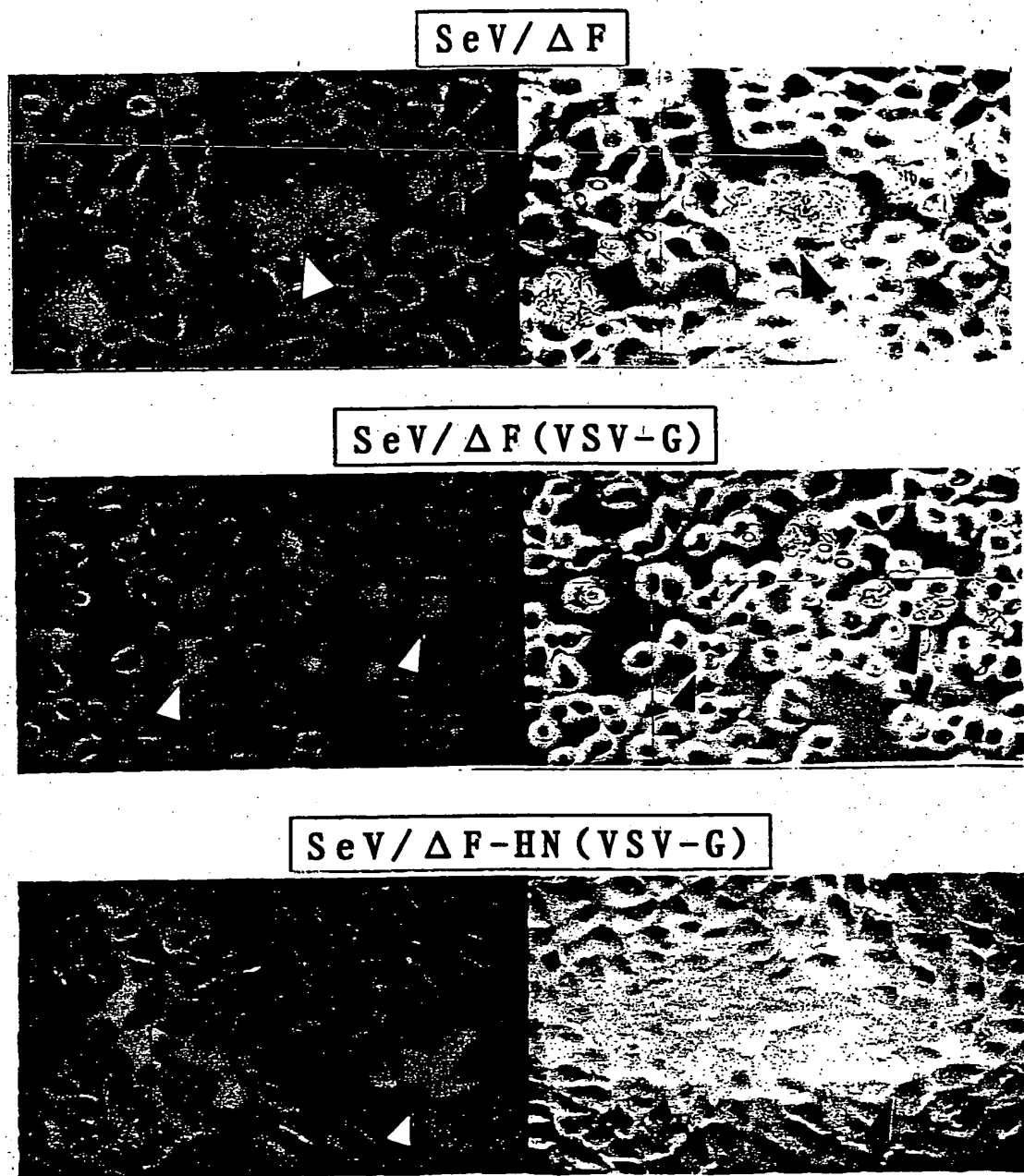
図 5 2



ショ糖 : 20-60% リニアグラディエント

53 / 62

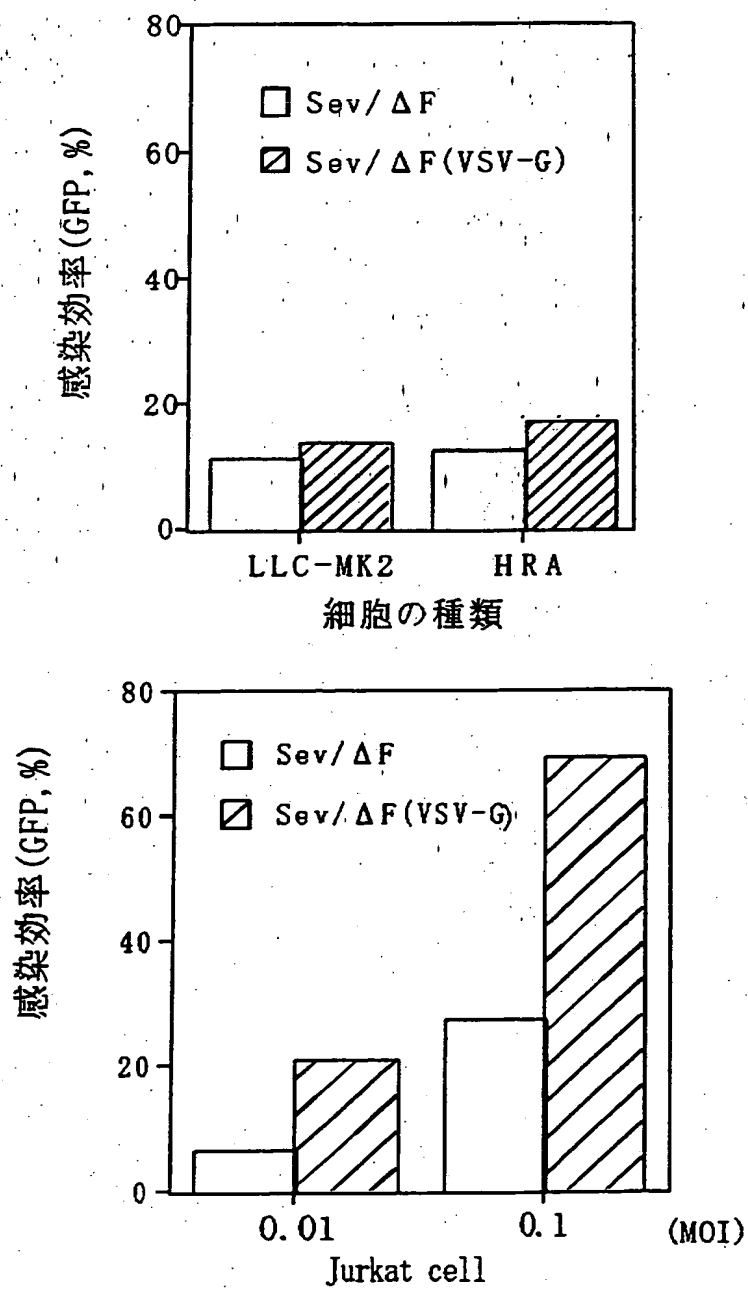
図 53



(LLC-MK2細胞)

54/62

図 5 4

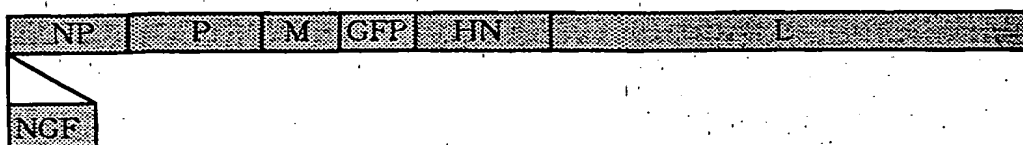


55/62

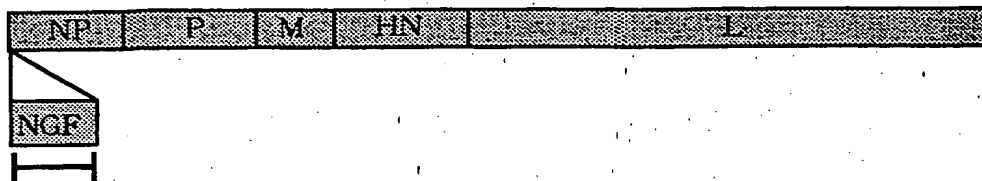
図 55

pSeV18<sup>+</sup>b(+)

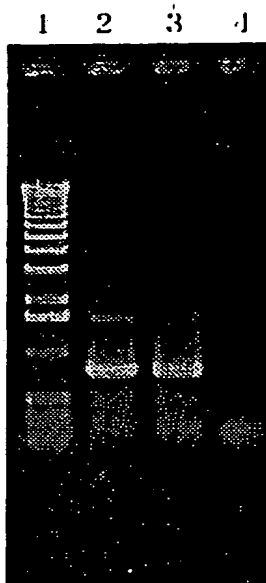
NGF/SeV/ΔF-GFP



NGF/SeV/ΔF



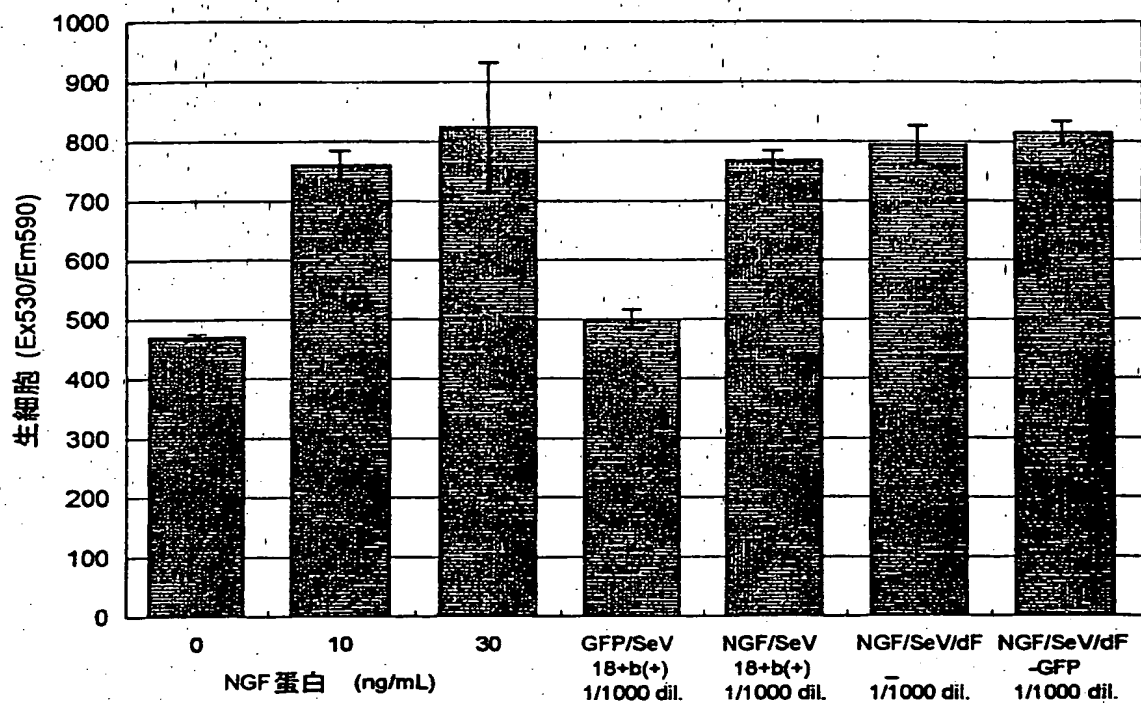
NGFプライマー (NGF-N~NGF-C)



1. マーカー
2. NGF/SeV/ΔF
3. NGF/SeV/ΔF-GFP
4. pSeV18<sup>+</sup>b(+)

56 / 62

図 56



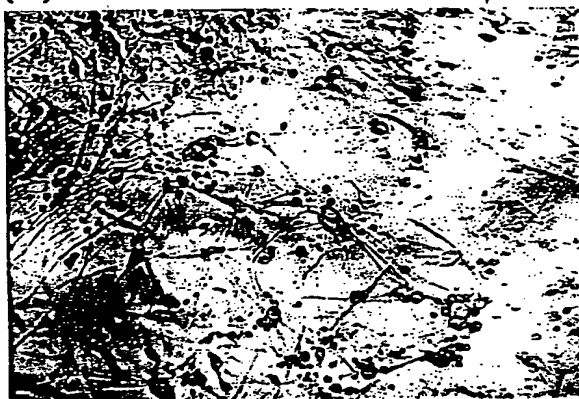
57/62

図 57

(A)



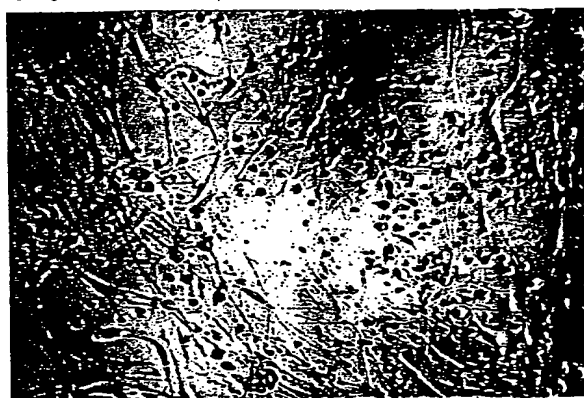
(B)



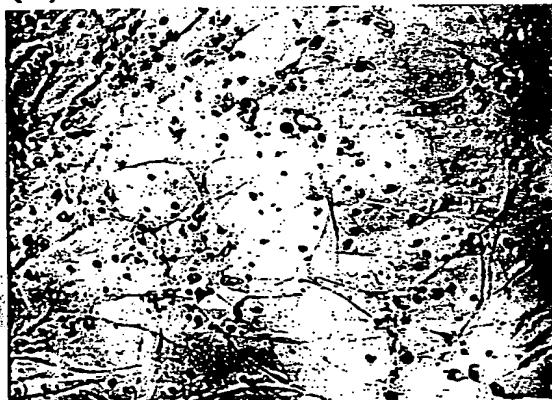
(C)



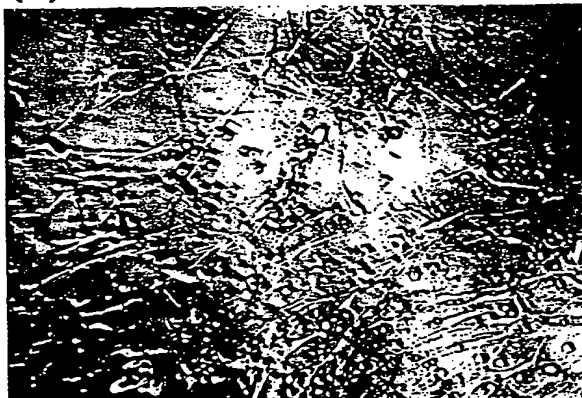
(D)



(E)

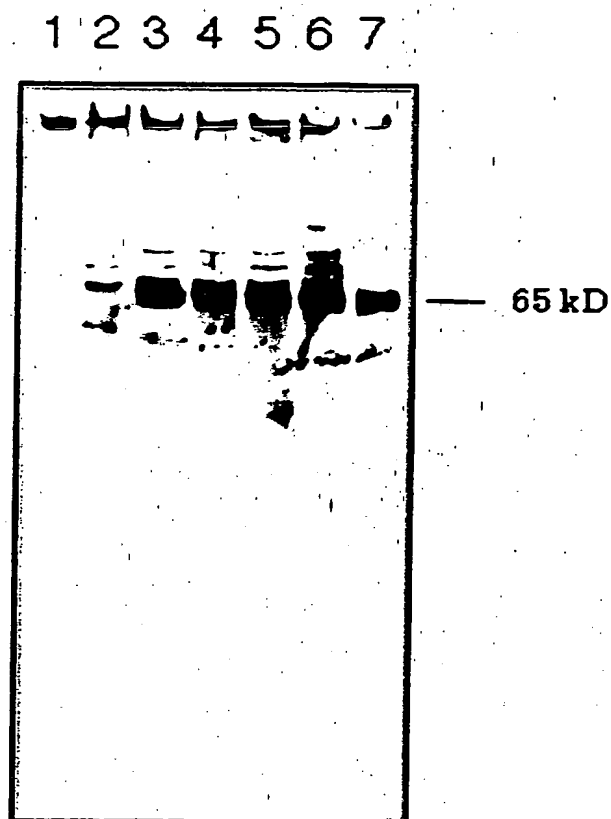


(F)



58/62

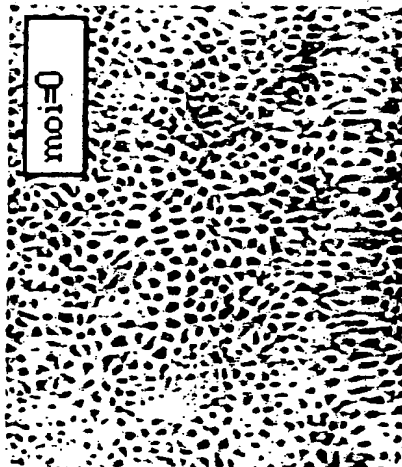
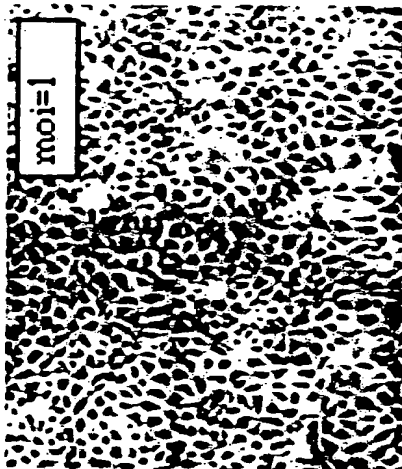
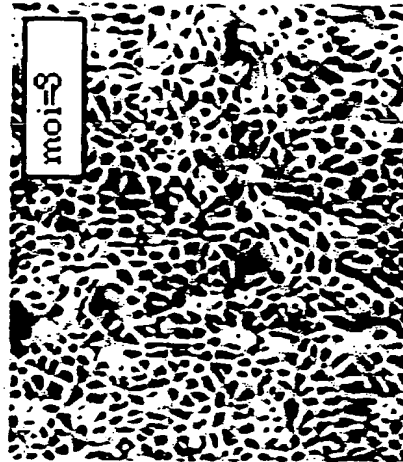
図 58



- 1: LLCMK2/Ad(moi=1)
- 2: LLCMK2/F/Ad(moi=0)
- 3: LLCMK2/F/Ad(moi=1)
- 4: LLCMK2/F/Ad(moi=3)
- 5: LLCMK2/F/Ad(moi=10)
- 6: LLCMK2/F/Ad(moi=30)
- 7: LLCMK2/F/Ad(moi=100)

59/62

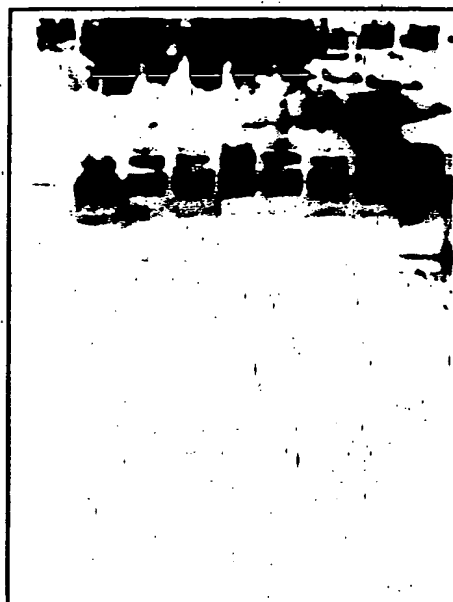
59



60 / 62

☒ 60

1 2 3 4 5 6 7 8 9



- 1 : LLC-MK2/Ad-Cre(Negative Control)
- 2 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P0
- 3 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P1
- 4 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P2
- 5 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P3
- 6 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P4
- 7 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P5
- 8 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P6
- 9 : LLC-MK2/F/Ad-Cre /P7

61/62

61

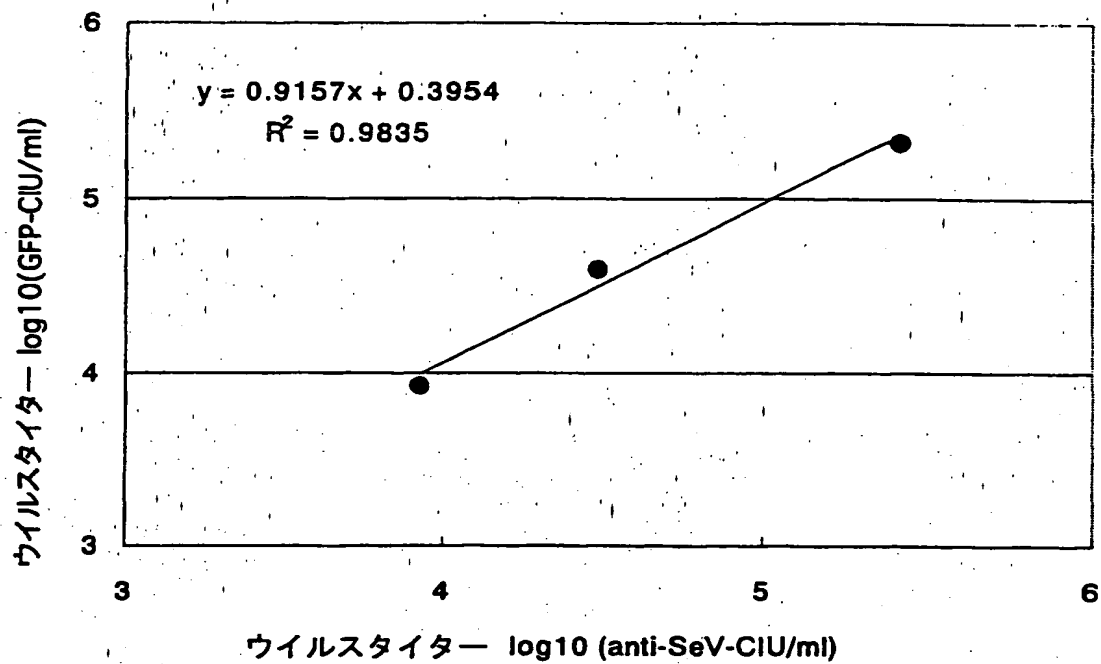
F6

F20



62 / 62

図 6 2



1/25

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> RNP derived from paramyxoviruses

<130> D3-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-200740

<151> 1999-05-18

<160> 52

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Sequence

2/25

&lt;400&gt; 1

atgcatgccg gcagatga

18

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 2

gttgagtact gcaagagc

18

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 3

3/25

tttgccggca tgcattttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

atgcatgccg gcagatga

18

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

tgggtgaatg agagaatcag c

21

4/25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

atgcatatgg tgatgcggtt ttggcagtac

30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 7

tgccggctat tattacttgt acagctcgtc

30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

5/25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 8

atcagagacc tgcgacaatg c

21

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 9

aagtcgtgct gcttcattgtg g

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

6/25

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 10

acaaccacta cctgagcacc cagtc

25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 11

gcctaacaca tccagagatc g

21

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

7/25

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

acattcatga gtcagctcgc

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

atcagagacc tgcgacaatg c

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

8/25

&lt;400&gt; 14

aagtcgtgct gcttcatgtg g

21

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 15

gaaaaactta gggataaagt ccc

23

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 16

9/25

gttatctccg ggatggtgc

19

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 17

gcgcggccgc cgtacggtgg caaccatgtc gtttactttg accaa

45

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 18

gcgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg ctattacttc 60

tgacaccaga ccaactgga

80

10/25

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 19

ccaccgacca caccagcgg ccgcgacagc caggcttcg g

41

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 20

ccgaagccgt ggctgtcgcg gccgctgggt gtggtcgggt g

41

&lt;210&gt; 21

11/25

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 21

gaaatttcac ctaagcggcc gcaatggcag atatctatag

40

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 22

ctatagatat ctgccattgc ggccgcttag gtgaaatttc

40

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

12/25

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 23

gggataaagt cccttgcggc cgcttggttg caaaactctc ccc

43

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 24

ggggagagtt ttgcaaccaa gcggccgcaa gggactttat ccc

43

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 25

ggtcgcgcgg tacttttagcg gccgcctcaa acaagcacag atcatgg

<210> 26

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 26

ccatgatctg tgcttggttg aggcgccgc taaagtaccg cgcgacc

<210> 27

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

14/25

synthesized sequence

&lt;400&gt; 27

cctgcccata catgacctag cggccgcttc ccattcaccc tggg

44

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 44

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 28

cccagggatga atgggaagcg gccgctaggt catggatggg cagg

44

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

15/25

&lt;400&gt; 29

gcggcgcgcc atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg

40

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 30

gcggcgcgcc ctatcatgt ctgctcgaag cggccggcgg

40

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 31

gcggccgcgt ttaaacggcg cgccatttaa atccgtagta agaaaaactt agggtgaaag 60

16/25

ttcatcgcg cgc

74

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 32

gcggccgcga tgaactttca ccctaagttt ttcttactac ggatttaa at ggcgcgccgt 60  
ttaaacgcgg cgc

74

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 33

acttgcgcc gccaaagttc agtaatgtcc atgttgttct acactctg

48

17/25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 34

atccgcgcc gcgatgaact ttaccctaa gtttttctta ctacggtcag cctcttcttg 60  
tagccttcct gc 72

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 35

ggagaagtct caacaccgtc cacccaagat aatcgatcag

40

18/25

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 36

ctgatcgatt atcttgggtg gacggtgttg agacttctcc

40

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 37

gtatatgtgt tcagttgagc ttgctgtcgg tctaaggc

38

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 38

19/25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 38

gccttagacc gacagcaagc tcaactgaac acatatac

38

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 39

caatgaactc tctagagagg ctggagtcac taaagagtta cctgg

45

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20/25

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 40

ccaggttaact ctttagtgac tccagcctct ctagagagtt cattg

45

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 41

gtgaaagttc atccaccgat cggctcactc gaggccacac ccaacccccac cg

52

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 52

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

21/25

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 42

cgggtgggggtt ggggtgtggcc tcgagtgagc cgatcgggtg atgaactttc ac 52

<210> 43

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 43

cttaggggtga aagaaatttc agctagcacg gcgcaatggc agatata 47

<210> 44

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

22/25

&lt;400&gt; 44

gatatctgcc attgcgccgt gctagctgaa atttctttca ccctaag

47

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 45

cttagggata aagtccttg tgcgcgcttg gttgcaaaac tctcccc

47

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 46

23/25

ggggagagtt ttgcaaccaa ggcgcacaa gggactttat ccctaag

47

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 47

ggtcgcgagg tacttttagtc gacacctcaa acaagcacag atcatgg

47

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 47

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 48

ccatgatctg tgcttgtttg aggtgtcgac taaagtaccg cgcgacc

47

24/25

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 49

cccagggtga atgggaaggg ccggccaggt catggatggg caggagtcc

49

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 50

ggactcctgc ccatccatga cctggccggc ccttcccatt caccctggg

49

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 72

25/25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 51

ggccgcttaa ttaacggttt aaacgcgcgc caacagtgtt gataagaaaa acttagggtg 60  
aaagttcatc ac 72

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 52

ggccgtgatg aactttcacc ctaagttttt cttatcaaca ctgttggcgc gcgtttaaac 60  
cgттааттаа gc 72

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03194

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/45, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/45, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Huntley CC et al., "Phosphorylation of Sendai virus phosphoprotein by cellular protein kinase C zeta.", J. Biol. Chem. (1997), Vol.272, No.26, pp.16578-16584	1-7
A	Rhironov OP et al., "Solubilization of matrix protein M1-M from virions occurs at different pH for orthomyxoviruses and paramyxoviruses", Virology (1990), Vol.176, No.1, pp.274-279	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 August, 2000 (15.08.00)

Date of mailing of the international search report  
12 September 2000 (12.09.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/03194

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/45, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/45, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Huntley CC et al. "Phosphorylation of Sendai virus phosphoprotein by cellular protein kinase C zeta." J Biol Chem. (1997) 第272巻 第26号 p.16578-16584	1-7
A	Rhirnov OP et al. "Solubilization of matrix protein M1-M from virions occurs at different pH for orthomyxoviruses and paramyxoviruses" Virology (1990) 第176巻 第1号 p.274-279	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**